

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**CORRELACIÓN ENTRE LA EVALUACIÓN “*IN VITRO*” E “*IN VIVO*” DE LA
SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE *BOTRYTIS CINEREA*:
ANILOPIRIMIDINAS**

por

Erica Soledad MARTÍNEZ FRÍAS

**TESIS presentada como uno
de los requisitos para obtener
el título de Ingeniero Agrónomo**

MONTEVIDEO

URUGUAY

2012

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. MSc. Vivienne Gepp

Ing. Agr. MSc. Diego Maeso

Ing. Agr. MSc. Pablo González

Fecha: 28 de diciembre de 2012

Autor: -----

Erica Soledad Martínez Frías

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a Carlos, a toda mi familia y amigos por su incondicional apoyo siempre.

A la Ing. Agr. MSc. Vivienne Gepp por su constante apoyo y por todo el tiempo y dedicación brindados en la elaboración de esta tesis.

A todas las personas que integran el grupo de trabajo del laboratorio de Protección Vegetal de la Facultad de Agronomía, por la colaboración prestada durante el desarrollo de éste trabajo.

Al Ing. Agr. Diego Maeso por sus aportes, sugerencias y el tiempo dedicado en la finalización de esta tesis.

Al Ing. Agr. Oscar Bentancur por su ayuda en el procesamiento de los datos estadísticos.

Al personal de biblioteca y documentación por su cordial atención siempre y por la importante ayuda brindada en la búsqueda de información y en la corrección de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 GENERALIDADES DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	3
2.1.1. <u>Clasificación taxonómica</u>	3
2.1.2. <u>Morfología y ciclo biológico</u>	4
2.1.3. <u>Diseminación e infección de <i>B. cinerea</i></u>	6
2.1.4. <u>Huéspedes susceptibles</u>	7
2.1.5. <u>Enfermedades que ocasiona y su sintomatología</u>	8
2.1.6. <u>Condiciones predisponentes para su desarrollo</u>	9
2.1.6.1 Otros factores predisponentes.....	9
2.1.7. <u>Manejo de la enfermedad</u>	10
2.1.7.1. Variedades resistentes.....	10
2.1.7.2. Control cultural.....	10
2.1.7.3. Control biológico.....	11
2.1.7.4. Control químico.....	12
2.1.8. <u>Restricciones en el control químico y manejo antiresistencia</u>	12
2.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS ANILOPIRIMIDINAS Y DE PIRIMETANIL EN PARTICULAR.....	14
2.2.1. <u>Anilopirimidinas</u>	14
2.2.1.1. Modo de acción.....	15
2.2.2. <u>Riesgo de desarrollar resistencia</u>	16
2.2.3. <u>Variación del comportamiento según el ambiente</u>	17
2.2.4. <u>Pirimetanil</u>	18
2.3. METODOLOGÍA DE TRABAJO CON <i>BOTRYTIS</i> EN LABORATORIO.....	19
2.3.1. <u>Desinfección del huésped</u>	19
2.3.2. <u>Factores de crecimiento e incubación</u>	20
2.3.2.1. Medios nutritivos.....	20
2.3.2.2. Temperatura y humedad.....	21
2.3.2.3. Luz.....	21
2.3.2.4. pH.....	21
2.3.3. <u>Inoculación</u>	21

2.3.3.1 Métodos.....	21
2.3.3.2. Concentración de la suspensión de esporas.....	22
2.3.3.3. Suplementación.....	23
2.3.4. <u>Evaluación</u>	23
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	25
3.1 MATERIALES UTILIZADOS	25
3.1.1. <u>Aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i></u>	25
3.1.2. <u>Especie vegetal utilizada como huésped</u>	26
3.2. ENSAYO DE METODOLOGÍA	27
3.2.1. <u>Procedimiento</u>	27
3.3. ENSAYO DE SENSIBILIDAD A PIRIMETANIL	27
3.3.1. <u>Elaboración de la suspensión de esporas</u>	27
3.3.2. <u>Preparación del material vegetal</u>	28
3.3.3. <u>Aplicación de tratamientos</u>	28
3.3.4. <u>Inoculación</u>	29
3.3.5. <u>Incubación</u>	29
3.3.6. <u>Evaluación</u>	29
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	30
4.1. ENSAYO DE METODOLOGÍA	30
4.2. RESULTADOS GENERALES DEL ENSAYO CON AISLAMIENTOS CON DIFERENTE CIM A PIRIMETANIL...	32
4.2.1. <u>Efecto del fungicida a diferente dosis sobre el desarrollo de la lesión causada por <i>Botrytis cinerea</i></u>	32
4.2.2. <u>Control del fungicida sobre el desarrollo de micelio y/o esporulación</u>	33
4.2.3. <u>Efecto de la sensibilidad <i>in vitro</i> a pirimetanil sobre el desarrollo de la lesión visto de dos formas</u>	34
4.2.3.1. Diámetro de la lesión.....	34
4.2.3.2. Control ejercido <i>in vivo</i> de pirimetanil sobre la enfermedad.....	38
4.2.4. <u>Fitotoxicidad</u>	41
5. <u>CONCLUSIONES</u>	42
6. <u>RESUMEN</u>	43
7. <u>SUMMARY</u>	44
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	45

9. ANEXOS.....

49

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Clasificación taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Botryotinia fuckeliana</i>	3
2. Características del grupo anilopirimidinas.....	14
3. Aislamientos de <i>Botrytis cinerea</i> con diferentes niveles de CIM utilizados en el ensayo.....	25
4. Diámetro medio de la lesión según tratamiento a los 7 días pos inoculación.....	36
5. Diámetro promedio de las lesiones a los 7 días pos inoculación según nivel de CIM y tratamiento.....	38
6. Porcentaje de control ejercido por pirimetanil sobre la enfermedad causada por <i>B. cinerea</i> a diferente dosis.....	39
7. Control relativo ejercido por el fungicida sobre el desarrollo de la enfermedad según nivel de CIM a pirimetanil de los aislamientos...	39
Figura No.	
1. Conidióforos de <i>Botrytis cinerea</i> (foto tomada en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía).....	5
2. Repiques de aislamientos originales de <i>B. cinerea</i>	26
3. Imagen tomada dos días luego de la inoculación prueba: (placa A) hoja con herida (C/H) en dos folíolos, (placa B) hoja con herida en un solo folíolo.....	31
4. Imagen tomada al séptimo día luego de la inoculación.....	31
5. Evolución del diámetro medio de la lesión según tratamiento.....	32
6. Evolución del porcentaje de repeticiones testigos con presencia de micelio.....	33

7. Crecimiento promedio de aislamientos con $CIM \leq 1$ mg/l desde el tercer hasta el séptimo día pos inoculación.....	34
8. Crecimiento promedio de aislamientos con $CIM \geq 8$ mg/l desde el tercer hasta el séptimo día pos inoculación.....	35
9. Folíolos de tomate con daños de fitotoxicidad causado por la aplicación de pirimetanil.....	41

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por hongos del género *Botrytis* son probablemente las más comunes y más ampliamente distribuidas en hortalizas, plantas ornamentales, frutales y plantas cultivadas en invernaderos en todo el mundo. Aparecen principalmente en forma de tizones en inflorescencias, tubérculos, bulbos, raíces, etc, atacando al cultivo en cualquier estado de desarrollo y pudiendo infectar cualquier parte de la planta. *Botrytis cinerea* ocasiona también pudriciones blandas secundarias en frutos y hortalizas cuando se almacenan, transportan y comercializan en el mercado (Agrios, 2008).

El desarrollo del patógeno es favorecido enormemente por las condiciones climáticas de Uruguay en donde predominan temperaturas templadas y una alta humedad ambiente, provocando pérdidas importantes en gran diversidad de cultivos. Se destacan por su importante producción en el país, frutilla, tomate, morrón, viña y arándano, también afecta a plantines de ornamentales y forestales principalmente cuando se encuentran en el vivero.

Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas negativas que genera, son muy numerosos los estudios que se han realizado sobre su biología, sobre las interacciones en las que éste participa y sobre sus posibles métodos de control (Benito et al., 2000).

En la actualidad en nuestro país el control de las enfermedades causadas por *Botrytis cinerea*, se basa en una combinación de medidas culturales y la aplicación de productos químicos, empleándose diferentes tipos de fungicidas, algunos con múltiples sitios de acción y otros más modernos, más efectivos pero con mayor riesgo de resistencia. Entre éstos se encuentran los grupos químicos bencimidazoles, dicarboximidias, fenilcarbamatos, anilino pirimidinas y carboxamidas (Gepp et al., 2011).

Los productos químicos han sido utilizados con éxito durante muchos años, sin embargo con el paso del tiempo el control de este hongo se ha vuelto cada vez más problemático, siendo que al día de hoy los agricultores no logran un control suficiente debido principalmente a la alta versatilidad genética del patógeno.

Ésta pérdida de efectividad de los productos sobre la incidencia y severidad de enfermedades causadas por *B. cinerea* es consecuencia de una variada gama de factores que interactúan entre sí dificultando su manejo. Entre éstos se destaca la aparición de cepas resistentes de *Botrytis cinerea* a los fungicidas utilizados para su control, debido fundamentalmente a su uso intensivo o inadecuado y al escaso número de botricidas alternativos permitidos (Latorre, 1986).

A su vez, los productos disponibles en el mercado se enfrentan cada vez más a revisiones y a la revocación de usos autorizados, despertando una creciente inquietud social por los problemas ambientales asociados a su uso (Elad et al., 2004).

Los numerosos casos de control insuficiente del patógeno con botricidas que han sido detectados en diversas partes del mundo, ha obligado a la sustitución de productos intensificando la investigación en busca de fungicidas con modos de acción alternativos. Es por este motivo, que durante la última década se han introducido nuevos compuestos como las anilinopirimidinas, fenilpirroles e hidroxianilidas, que representan herramientas poderosas para su uso en estrategias de gestión anti-resistencia (Elad et al., 2004).

El presente trabajo surge a partir del Proyecto “Resistencia a fungicidas y variabilidad genética de *Botrytis cinerea* en el Uruguay” llevado a cabo en las Facultades de Agronomía y de Química de la Universidad de la República, en el cual se evaluó la sensibilidad a diferentes fungicidas en 169 aislamientos monospóricos de *B. cinerea* provenientes de seis cultivos, arándano, tomate, frutilla, viña, rosál y eucalipto, aislados a partir de material vegetal infectado recolectado en más de 50 predios ubicados en diferentes partes del país entre 2006 y 2008. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los fungicidas más utilizados en Uruguay para el control de la enfermedad, detectándose diferencias de sensibilidad entre los aislamientos recolectados de las diferentes especies. En el caso de pirimetanil (Mythos, BAYER), un tercio de la población evaluada presentó una CIM > 8 mg/l (Gepp et al., 2012).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si las diferencias de sensibilidad al fungicida, medidas como concentración mínima inhibitoria para pirimetanil, detectadas en ensayos realizados *in vitro* con *Botrytis cinerea*, se correlacionan con el comportamiento del hongo *in vivo*, para poder estimar el significado de los ensayos *in vitro* sobre las posibilidades de control a campo.

Los ensayos realizados para la elaboración de éste trabajo se llevaron a cabo en el laboratorio de la Unidad de Protección Vegetal de la Facultad de Agronomía. Como material vegetal se utilizaron hojas desprendidas de tomate que se inocularon con suspensiones de esporas obtenidas de los aislamientos seleccionados, luego de ser sometidas a tres diferentes tratamientos que correspondieron a un testigo con aplicación de agua destilada, y dos tratamientos con aplicación de fungicida pirimetanil a la dosis total recomendada en la etiqueta y a la mitad de la misma. Se evaluó el desarrollo de la enfermedad diariamente a partir de las 48 horas pos inoculación, cuantificándolo a través de la medición del avance del hongo sobre la superficie de la hoja.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. GENERALIDADES DE *BOTRYTIS CINEREA*

El género *Botrytis* constituye un grupo de hongos fitopatógenos ampliamente distribuido a nivel mundial, en el que se pueden encontrar especies que parasitan a una sola especie vegetal y una especie, denominada *Botrytis cinerea*, capaz de infectar al menos 235 especies de plantas distintas. Es por esta razón que durante mucho tiempo se pensó que *B. cinerea* era un hongo no especializado, a diferencia de las otras especies del género. A modo de ejemplo se menciona que *B. tulipae* afecta sólo a los tulipanes, *B. squamosa* se encuentra solo en los cultivos de cebolla, *B. allii* en *Allium* spp y *B. fabae* en leguminosas (Elad et al., 2004).

El gran número de huéspedes, la gran distribución y la importancia de los daños que ocasiona *B. cinerea*, justifican el enorme interés que despierta este patógeno, siendo, desde hace más de 175 años, objeto de numerosos estudios relacionados con su fisiología, bioquímica, patogenicidad y el control de la enfermedad (Espinosa de los Monteros, 2006).

2.1.1. Clasificación taxonómica

B. cinerea es el anamorfo de *Botryotinia fuckeliana*, un hongo ubicuo que causa el moho gris en muchos cultivos de importancia económica. Su estado sexual ha sido hallado en muy pocas oportunidades en el mundo (Agrios, 2008)

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea* y *Botryotinia fuckeliana*

	Estado asexual	Estado sexual
Reino	Fungi	Fungi
División	Deuteromycota	Ascomycota
Clase	Hyphomycetes	Discomycetes
Orden	Moniliales	Helotiales
Familia	Moniliaceae	Sclerotiniaceae
Género	<i>Botrytis</i>	<i>Botryotinia</i>
Especie	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

Fuente: Ten Have, citado por Rivera (2007)

2.1.2. Morfología y ciclo biológico

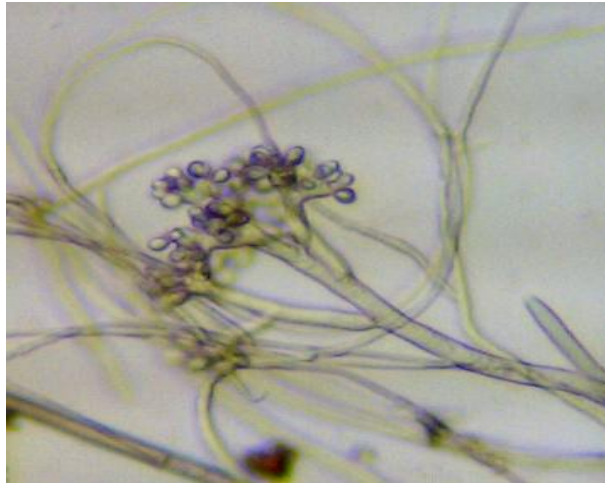
Botrytis cinerea es un hongo imperfecto con una morfología sencilla (Alexopoulos, 1966) que bajo condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo produce abundante micelio gris formado por numerosas hifas o conidióforos largos y ramificados, con los conidios en los extremos de las ramas finales de éstos. Los conidióforos junto con los conidios se asemejan a un racimo de uvas, dándole origen al nombre de patógeno (Agrios, 2008).

Las hifas que componen el micelio de *B. cinerea* se encuentran generalmente tabicados y en forma cilíndrica, multiplicándose por lo general vegetativamente mediante una división citoplasmática. Sin embargo, es común que tenga lugar una división nuclear de esos filamentos sin que se haya producido división citoplasmática, lo que da lugar a hifas cenocíticas con un elevado y variable número de núcleos (Alexopoulos, 1966).

Los conidióforos son hifas especializadas que tienen la capacidad de producir esporas o conidios en sus extremos superiores de manera erguida, encontrándose simples o ramificados (Alexopoulos, 1966). En *B. cinerea* éstas estructuras presentan 2 mm de longitud aproximadamente y entre 16 – 30 micras de espesor. Generalmente los conidióforos se encuentran ramificados, presentando un tallo y una especie de cabeza constituida por un elevado número de pequeñas ramas abiertas. Poseen una tonalidad suave y clara, la parte inferior o tallo es de color marrón claro, tornándose más pálido hacia la zona del ápice con los extremos de las ramas a menudo bastante incoloro (Commonwealth Mycological Institute, 1976).

Por su parte, los conidios de *B. cinerea* presentan un tamaño relativamente grande, pueden encontrarse de forma esférica, oval o limoniforme, con una tonalidad incolora a marrón pálido o suave. Los mismos una vez formados sobre los conidióforos se desprenden o liberan y son transportados a diferentes distancias. Una vez en contacto con un posible huésped las esporas germinan produciendo hifas, que formaran el nuevo micelio. De esta forma, sobre los conidióforos se producen nuevamente esporas, repitiéndose el ciclo (Alexopoulos, 1966).

Figura1. Conidióforos de *B. cinerea*, (foto tomada en el laboratorio de Fitopatología de Facultad de Agronomía)



B. cinerea es un hongo pleomórfico que presenta una fase sexual o perfecta y una fase asexual o imperfecta. En la naturaleza se ha observado en muy pocas ocasiones esporas sexuales o ascosporas por lo que se supone que esta forma de reproducción tienen poca importancia en la supervivencia del hongo y en su capacidad de causar enfermedad en las plantas.

La etapa sexual de *Botrytis* se forma en órganos infectados solo al final de la estación de crecimiento de las plantas o bien cuando ha disminuido el suministro alimenticio de la misma. En esta fase tiene lugar la fecundación de la célula sexual femenina denominada ascogonio por una pequeña espóra sexual masculina denominada espermacio (Agrios, 2008).

El ascogonio una vez fecundado produce numerosas hifas cuyas células terminales se desarrollan en un asca. Las ascas son estructuras en forma de saco que contienen en su interior un determinado número de ascosporas, las cuales han sido formadas por la fusión de dos núcleos dando origen a un cigoto que sufre meiosis y forma cuatro núcleos haploides. Posteriormente, la célula en la que esos núcleos se encuentran, se alarga y los cuatro núcleos se dividen por mitosis produciendo ocho núcleos haploides, cada núcleo queda rodeado por una porción de citoplasma y se recubre de una pared formando así una espóra dentro de un asca, o sea, una ascospora. Las ascas se forman en un ascocarpo abierto con forma de plato o copa denominado apotecio (Agrios, 2008).

En cambio, el estado asexual o imperfecto del hongo se caracteriza por la proliferación de hifas sobre el sustrato que coloniza, dando lugar a la formación de

micelio, desde donde surgen las estructuras básicas de hongo. Por un lado, los conidióforos o macroconidióforos en cuyos extremos se desarrollan los conidios, los cuales puestos en contacto con el sustrato y en condiciones adecuadas germinan dando lugar a un nuevo micelio. También, a partir de las hifas del micelio, se pueden originar los microconidióforos que forman los microconidios y los esclerocios (Espinosa de los Monteros, 2006). Estos últimos son las principales estructuras de resistencia frente a las condiciones ambientales desfavorables que presenta *B. cinerea*, son estructuras resistentes de consistencia dura, que tienen la capacidad de permanecer latente por largos períodos de tiempo y germinar cuando se presentan las condiciones favorables (Alexopoulos, 1966).

Los ataques de *B. cinerea* generalmente se originan por la acción del micelio desarrollado en tejidos parasitados, los cuales sirven como base alimenticia. Al existir condiciones ambientales favorables y dependiendo del tejido parasitado, la incubación de *B. cinerea* ocurre en pocas horas y rápidamente se producen re-infecciones debido a que el inóculo secundario (conidios) aparece casi conjuntamente con el desarrollo de los primeros síntomas. Se trata de una enfermedad excepcionalmente agresiva con muy breve tiempo de incubación y una alta tasa de desarrollo (Latorre, 1986).

2.1.3. Diseminación e infección de *B. cinerea*

Los conidios o esporas constituyen la principal estructura de dispersión de *B. cinerea* así como también sus formas de resistencia (Elad et al., 2004). Los mismos son transportados en gran número por el viento a cortas o medianas distancias, en algunos cultivos se han registrado más de 10,000 conidios /m³ de aire. De esta manera el hongo se redistribuye eficientemente entre los cultivos hasta alcanzar tejidos vulnerables donde desarrollarse. La liberación de los conidios aparentemente se debe a un mecanismo higroscópico, que ocurre cada vez que existen rápidos cambios de humedad relativa en el ambiente. Sin embargo, la lluvia, por un fenómeno de salpicado, parece tener también importancia tanto en la liberación como en la diseminación de conidios a cortas distancias (Latorre, 1986).

Una vez que una espora de *Botrytis* se encuentra alojada sobre la superficie vegetal de un posible huésped, para poder ingresar, debe desarrollar un tubo germinativo con un apresorio en su extremo distal, antes de iniciar la penetración propiamente dicha. El apresorio corresponde a una pequeña dilatación del extremo del tubo germinativo, el que se adhiere al sustrato gracias a la secreción de sustancias mucilaginosas que posiblemente correspondan a polisacáridos. Aparentemente la presencia de mínimas concentraciones de nutrientes sobre el sustrato estimula la formación de un apresorio (Elad et al., 2004). A partir de éste se originan finas hifas penetrantes, las cuales atraviesan el tejido vegetal de diversas formas facilitando la penetración (Latorre, 1986).

El ingreso del patógeno a la planta puede darse de forma directa o indirecta atravesando la cutícula y la epidermis vegetal. La penetración directa ocurre por la perforación mecánica de los tejidos y/o por la acción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la cutícula vegetal. Por otro lado, el hongo puede penetrar también indirectamente a través de heridas o daños en las plantas causados por heladas, insectos, labores culturales, etc., o por aberturas naturales, principalmente estomas y estigmas. En ambos mecanismos de penetración, los conidios y posteriormente las hifas de *B. cinerea* deben establecer un contacto con algún órgano susceptible del cultivo, al mismo tiempo que las condiciones ambientales de humedad relativa y temperatura del medio deben ser favorables para su germinación (Latorre, 1986).

Sin embargo, los conidios son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo. En condiciones naturales, la viabilidad de estos conidios depende de las condiciones ambientales como temperaturas extremas, humedad, exposición a la luz solar, etc, habiéndose demostrado que el espectro de luz ultravioleta es el factor ambiental más importante en la mortalidad de los mismos (Elad et al., 2004).

2.1.4. Huéspedes susceptibles

Botrytis cinerea es un parasito inespecífico, tiene la capacidad de desarrollarse y causar infección en más de 200 plantas diferentes, entre las cuales encontramos especies de diversos cultivos hortícolas tanto a campo como en invernáculo (Cassanello, 2000).

Prácticamente no hay fruto fresco, hortaliza, bulbo u otros órganos que no sean atacados por *B. cinerea* cuando se encuentran en condiciones de almacenamiento (Agrios, 2008).

2.1.5. Enfermedades que ocasiona y su sintomatología

Las enfermedades causadas por *Botrytis* son probablemente las más comunes y conocidas en todo el mundo, sus síntomas dependen del órgano de la planta que es infectado y de las condiciones ambientales presentes en el momento de dicha infección, teniendo la capacidad de actuar como patógeno y como saprofito a la vez. La expresión de los síntomas de la enfermedad en el huésped se debe a enzimas pectolíticas, ácidos orgánicos y toxinas formadas de polisacáridos que son producidas y liberadas por el hongo (Commonwealth Mycological Institute, 1974).

La enfermedad se manifiesta principalmente en forma de tizones en las inflorescencias y pudriciones en los frutos, pero también aparece como canchales,

podriciones de tallos, ahogamiento de plántulas, manchas foliares y como pudriciones en tubérculos, bulbos y raíces (Commonwealth Mycological Institute, 1974).

B. cinerea tiene la capacidad de establecerse en los pétalos de las flores, los que son particularmente susceptibles cuando comienzan a envejecer produciendo abundante micelio, si el clima es húmedo y fresco, el micelio del hongo produce numerosos conidios que ocasionan más infecciones dispersando la enfermedad. Desde ese lugar invade fácilmente los frutos y tallos suculentos de plantas susceptibles. Posteriormente a la infección esos órganos se ablandan y vuelven acuosos coloreándose de un tono color canela o marrón claro, tornándose grisáceos durante la desecación. Conforme se pudren los tejidos, la epidermis se rompe, se arruga o pierde tenacidad, se deshidrata y el hongo es capaz de producir esclerocios aplanados de color negro sobre la superficie o hundidos sobre el tejido como estrategia de sobrevivencia (Commonwealth Mycological Institute 1974, Agrios 2008).

Otro síntoma característico del género *Botrytis* es la generación de manchas foliares en sus hospedantes, dichas manchas son pequeñas y amarillentas al principio pero posteriormente se extienden y adquieren un color canela o gris blanquecino, se hunden y a menudo cubren toda la hoja. Las manchas causadas en los tallos pueden presentarse hundidas, alargadas y de color oscuro con un contorno bien definido o bien pueden extenderse sobre el tallo y hacer que éste se debilite y quiebre a nivel de la zona de infección (Agrios, 2008).

En frutos y hortalizas en poscosecha, *B. cinerea* causa los conocidos "mohos grises" o pudriciones, tanto en el campo como bajo condiciones de almacenamiento, estas pudriciones pueden iniciarse en las inflorescencias, en el extremo del pedúnculo del fruto, o bien en cualquier herida, hendidura o incisión de los tejidos de los órganos almacenados. Dicha pudrición tiene el aspecto de un área bien definida, parduzca y aguanosa, la cual penetra profundamente y avanza con gran rapidez en los tejidos del órgano. En la mayoría de los hospederos y bajo condiciones de alta humedad se desarrolla una capa fructífera conspicua de moho aterciopelada granular y de color grisáceo o gris parduzco sobre la superficie de las áreas putrefactas (Agrios, 2008).

2.1.6. Condiciones predisponentes para su desarrollo

Los factores climáticos más relevantes que inciden el ataque de los cultivos por *Botrytis cinerea* son la temperatura y la humedad relativa. Las temperaturas ambientales frescas entre 15-18°C son muy favorables, sin embargo, *Botrytis* tiene la capacidad de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas, como por ejemplo a 0°C aunque con mayor lentitud. Otro factor fundamental es la alta humedad relativa en el ambiente con valores superiores al 80%. Debido a que el hongo tiene la capacidad de crecer y sobrevivir en un amplio rango de temperaturas, la humedad relativa presente en el

ambiente podría ser el factor limitante para el establecimiento de la enfermedad en los cultivos (Giménez et al., 2003).

Por lo tanto, las lluvias o rocíos prolongados son extremadamente predisponentes a las infecciones causadas por *Botrytis* sp. si ocurren durante la cosecha de los cultivos, en estos casos es aconsejable posponer la misma (Giménez et al., 2003).

2.1.6.1 Otros factores predisponentes

Además de los factores principales predisponentes para el desarrollo de la enfermedad como son la humedad y la temperatura, existen otros que en mayor o menor medida favorecen la incidencia de enfermedades causadas por *B. cinerea*. Entre estos factores Latorre (1986) destaca los siguientes refiriéndose al cultivo de vid específicamente, pero es posible adaptar los mismos a diversos cultivos susceptibles a este patógeno:

- Manejo de la canopia: un excesivo sombreado proporciona condiciones de alta humedad, por esto siempre se recomienda mejorar la ventilación de los cultivos mediante una poda. Con la sola eliminación de hojas se puede reducir significativamente la incidencia final de la enfermedad y al mismo tiempo se facilita el control químico.

- Compactación y sobrecargas de frutos, en este caso, se favorece la diseminación secundaria por el simple contacto entre los mismos, al mismo tiempo se crea un microambiente muy húmedo que estimula el desarrollo de la enfermedad. La calidad de la fruta que madura bajo estas condiciones puede ser seriamente reducida por pudriciones que son promovidas por la alta humedad, baja ventilación y reducida penetración de pesticidas.

- La fertilización nitrogenada exagerada, favorece la incidencia de este tipo de enfermedades en diversos cultivos. Las altas dosis de nitrógeno promueven un gran desarrollo vegetativo e indirectamente un sombreado excesivo y escasa ventilación.

- Los daños causados por insectos, aves, labores culturales o producidos como consecuencia de lluvia o rocío favorecen el rápido desarrollo de *B. cinerea*, tanto por favorecer la penetración como por estimular la germinación de los conidios, en parte al menos por la mayor excreción de nutrimentos (posiblemente carbohidratos) para estimular éstos procesos.

- El manejo inadecuado del agua de riego puede indirectamente favorecer el desarrollo del hongo. Se sugiere evitar el uso de grandes caudales y los riegos muy frecuentes, especialmente durante la cosecha.

2.1.7. Manejo de la enfermedad

Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas que tiene en cultivos de importancia, numerosos estudios se han realizado sobre su biología, sobre las interacciones en las que participa y sobre los posibles métodos de control (Benito et al., 2000).

Para un eficaz control de las enfermedades causadas por *Botrytis cinerea* se debe considerar varios factores de forma de definir una estrategia de control integrado de la enfermedad en el cual interactúen el control cultural, el control químico y el control biológico. Principalmente se deben desarrollar medidas de control cultural evitando un microclima predisponente al desarrollo de la enfermedad (Espinosa de los Monteros, 2006).

Sin embargo, su control no resulta sencillo por diversas razones: es capaz de atacar cultivos en cualquier estado de desarrollo, incluida la poscosecha, infecta cualquier órgano vegetal, es hábil para crecer a temperaturas de almacenamiento muy bajas y es genética y morfológicamente heterogéneo, lo que le posibilita un crecimiento y desarrollo diferente en condiciones de cultivo desiguales (Espinosa de los Monteros, 2006).

2.1.7.1. Variedades resistentes

Las posibilidades de desarrollar estrategias de control basadas en genotipos resistentes son reducidas, ya que no se han descrito genes de resistencia en las especies que infecta y además, la diversidad fenotípica que muestran los distintos aislamientos del hongo es enorme (Benito et al., 2000).

2.1.7.2. Control cultural

La potencialidad destructiva de *Botrytis cinerea* es extremadamente alta en zonas de clima templado y húmedo, como son las condiciones de Uruguay. Bajo esta situación los tratamientos químicos son generalmente insuficientes para obtener un buen control, siendo indispensable revisar prácticas de manejo de los cultivos para prevenir condiciones favorables para el patógeno (Latorre, 1986).

Para el control de la enfermedad se proponen numerosas estrategias culturales con el fin de evitar factores predisponentes para su desarrollo, Cassanello (2000), Agrios (2008) mencionan las siguientes:

- Realizar rotaciones con diferentes cultivos en el predio.

- Retirar y eliminar mediante fuego los restos de plantas infectadas dentro y fuera del invernáculo luego de la finalización de cada ciclo de cultivo, así como de los lugares de almacenamiento.
- Mantener una adecuada densidad de plantación para evitar excesiva humedad entre plantas por falta de aireación proporcionando una rápida desecación tanto de las plantas como de sus productos.
- Realizar las tareas de poda desbrote, deshoje y raleo de frutos en el momento oportuno.
- Adecuada fertilización especialmente nitrogenada para evitar gran desarrollo del follaje.
- Evitar riegos excesivos para no crear condiciones de elevada humedad.
- Realizar solarización a los canteros antes de la siembra de los cultivos para disminuir las fuentes de inóculo que puedan existir en el suelo.

2.1.7.3. Control biológico

En Uruguay desde hace varios años se han llevado a cabo estudios tendientes a desarrollar métodos de control biológico de patógenos de plantas. La investigación desarrollada en varios ámbitos nacionales, se ha basado principalmente en la búsqueda de microorganismos nativos capaces de controlar el desarrollo de enfermedades causadas por cepas locales de patógenos (Vero y Mondino, 2002).

Estudios realizados por investigadores en diferentes partes del mundo para evaluar la acción del género *Trichoderma* como agente de biocontrol en el cultivo de la vid, demostraron que el desarrollo de *Botrytis cinerea* se ve inhibido notoriamente por la presencia de estos hongos. La acción de *Trichoderma* reduciendo la población de *Botrytis*, tanto en hojas, en flores como en frutos, se debería a la competencia que surge entre los hongos por obtener nutrientes para su crecimiento y desarrollo, así como en ocupar la superficie de estos órganos evitando el avance de la enfermedad (Elad et al. 1993, Harman et al. 1996, Latorre et al., citados por Vero y Mondino 2002).

Por su parte Lisboa (2003) en base a los resultados obtenidos en su trabajo de tesis, señala que una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* fue efectiva en reducir significativamente la incidencia de la pudrición causada por *B. cinerea* en racimos de uva cultivar Sauvignon Blanc, cuando fue aplicada en floración y apriete o en estos estados más una tercera aplicación en pinta. También menciona que una cepa de bacterias del género *Bacillus*, *Bacillus subtilis*, fue efectiva en reducir significativamente la incidencia y severidad causada por *B. cinerea* en racimos de uva, cuando fue aplicada en floración o en ésta y los demás estados críticos para la infección, como apriete y pinta.

2.1.7.4. Control químico

El control de patógenos fúngicos de plantas se ha caracterizado por ciclos repetidos de introducción de nuevos productos químicos. Este tipo de control depende principalmente de la disponibilidad y validez de esos productos. Sin embargo, el empleo de fungicidas es cada vez menos recomendable y más restringido debido a los problemas de contaminación ambiental que de su aplicación se derivan, estando su utilización a restricciones tales como el período de espera entre la última aplicación y la cosecha, problemas de residuos, etc (Benito et al., 2000).

Por otra parte, la gran adaptabilidad de las cepas de *Botrytis cinerea* a los botricidas comerciales ha llevado en múltiples situaciones a la aparición de cepas resistentes, lo que ha hecho necesario un cambio continuado de fungicidas y un incremento considerable de las dosis, con el consiguiente riesgo de persistencia de estos productos en el suelo (Espinosa de los Monteros, 2006) y un rápido aumento de la fracción de la población del patógeno que es resistente a los fungicidas (Van den Bosch et al., 2011).

Los productos disponibles en el mercado y más comúnmente utilizados para el control de *B. cinerea* pertenecen a los grupos químicos de los bencimidazoles, como benomil, metil-tiofanato, carbendazima, que fueron introducidos en el mercado mundial en la década del 60, las dicarboximidas como iprodione y viclozolin, que han sido utilizadas desde fines de los años 70 y fenilcarbamatos (Morales, citado por Lisboa, 2003). Debido a los problemas de desarrollo de resistencia y resistencia cruzada que han sido detectados, continuamente están apareciendo nuevas familias de productos para el control de *B. cinerea* como por ejemplo las estrobilurinas, los fenilpirroles y las anilino pirimidinas (ciprodinil, mepanipirim, pirimetanil), este último es un grupo de fungicidas más moderno, introducido en el mercado mundial desde la década del 90 (Gepp et al., 2011).

2.1.8. Restricciones en el control químico y manejo antiresistencia

Botrytis cinerea ha sido clasificado como uno de los patógenos de plantas más importante del mundo en presentar alto riesgo a desarrollar resistencia a varias clases de fungicidas, en un intervalo de tiempo suficientemente corto como para considerarse una grave amenaza para el éxito comercial de gran variedad de cultivos (FRAC, 2005).

Si bien el uso de botricidas ha sido una forma eficaz para proteger los cultivos contra el ataque de *Botrytis sp.*, el éxito de este control requiere de aplicaciones preventivas de fungicidas en dosis que son generalmente más altas que las utilizadas contra otras enfermedades fúngicas (Elad et al., 2004). Además, especialmente en el caso de producción de fruta, aplicaciones justo antes o después de la cosecha son

deseables desde el punto de vista del control de la enfermedad, pero esta práctica está restringida a causa de los riesgos toxicológicos presentados por sus residuos (Leroux et al., 2004).

Otra grave restricción al uso de botricidas, está dada por los múltiples fenómenos de resistencia detectados en diversas zonas y cultivos. Esta pérdida de sensibilidad a los fungicidas se genera a causa de mutaciones o cambios genéticos o epigenéticos en los individuos de la población que es heredado por sus descendientes, produciéndose posteriormente la selección de individuos con este genotipo alterado causando su dominancia en la población (Van den Bosch et al., 2011).

El desarrollo de resistencia se encuentra asociado a los sitios de acción sobre los que actúan varias familias de fungicidas, incluyendo los más utilizados, que han debido ser sustituidos en gran medida debido a que se ha detectado una disminución en el nivel de eficacia sobre el control de la enfermedad a causa de una menor sensibilidad detectada en *B. cinerea* a dichos productos (Brent y Hollomon, 2007a), esto se debe principalmente a un uso prolongado en el tiempo. En consecuencia, ha sido necesaria la búsqueda de nuevos compuestos químicos, con diferente modo de acción que representen una alternativa para el control de la enfermedad. Como ya se mencionó, recientemente se han introducido en el mercado productos como las anilino pirimidinas, fenilpirroles, estribilurinas e hidroxianilidas, que representan herramientas para su uso en estrategias de gestión anti-resistencia (Leroux et al., 2004).

También se han propuesto otras estrategias para prevenir o retardar el desarrollo de cepas resistentes, como son el uso de mezclas y/o rotaciones de fungicidas de distinto modo de acción, racionalizar el número de aplicaciones o en su defecto, restringirlas a los períodos críticos y realizar control integrado haciendo un mayor uso de prácticas culturales (FRAC, 2005).

Por ejemplo, en los viñedos franceses, contra el moho gris, la recomendación actual es alternar los distintos grupos de fungicidas con un máximo de una aplicación por año para cada familia química (Elad et al., 2004).

Como se mencionó, uno de los casos más concretos de desarrollo de resistencia por parte de *Botrytis cinerea* es el de la familia de los bencimidazoles y la de las dicarboximidias, fungicidas ampliamente utilizados para el control de la enfermedad. En el caso de las anilino pirimidinas a pesar de tratarse de una familia relativamente nueva, hay que tener presente que ya se han visto problemas de baja eficacia en el control de moho gris en viñedos debido a cierta pérdida de sensibilidad.

2.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS ANILOPIRIMIDINAS Y DE PIRIMETANIL EN PARTICULAR

2.2.1 Anilopirimidinas

Mepanipirim, pirimetanil y ciprodinil son fungicidas pertenecientes al grupo químico de las anilopirimidinas, presentan un amplio espectro de acción y tienen un uso potencial en una amplia variedad de especies. Mepanipirim y pirimetanil son ampliamente utilizados especialmente para el control de enfermedades causadas *B. cinerea* en vid y otros cultivos (Hewitt, 1998).

Los fungicidas pertenecientes a este grupo comenzaron a ser utilizados en el Uruguay a mediados de la década de 1990, en una formulación mezcla de ciprodinil (anilopirimidina) con fludioxinil (fenilpirrol), ambos productos poseen diferente sitio de acción en el hongo. Desde fines de la misma década se ha estado utilizando el pirimetanil formulado sin otro principio activo para el control de *B. cinerea* en varios cultivos (Gepp et al., 2012).

En el Proyecto “Resistencia a fungicidas y variabilidad genética de *Botrytis cinerea* en el Uruguay”, se observó que un tercio de población evaluada *in vitro* presentó una CIM ≥ 8 mg/l para pirimetanil, siendo el efecto hospedero altamente significativo sobre la sensibilidad a este fungicida (Gepp et al., 2012).

2.2.1.1 Modo de acción

Cuadro 2. Características del grupo anilopirimidinas.

Modo de Acción	Nombre del Grupo	Grupo Químico	Nombre Común	Comentarios	Código FRAC
Síntesis de aminoácidos y proteínas.	AP - fungicidas (Anilino - Primidinas)	Anilopirimidinas.	Ciprodinil Mepanipirim Pirimetanil	Resistencia conocida en <i>Botrytis</i> y <i>Venturia</i>	9

Fuente: FRAC (2012b).

Diversos estudios señalan, que el modo de acción de las anilopirimidinas es diferente al de las otras clases de fungicidas, debido a que no hay informes que indiquen la existencia de casos de resistencia cruzada con los demás productos disponibles en el mercado y comúnmente utilizados para el control de *Botrytis cinerea*, como

bencimidazoles y dicarboximidas (Forster y Staub 1996, Hewitt 1998, Petsikos-Panayotarou et al. 2002, Fritz 2003, Leroux et al. 2004, Moyano et al. 2004).

Las anilopirimidinas actúan principalmente interfiriendo con la biosíntesis del aminoácido metionina (Topolovec-Pintari y Cvjetkovi 2002, Fritz 2003, Moyano et al. 2004) y presenta también la capacidad de inhibir la secreción de enzimas hidrolíticas, por ejemplo, proteasas, celulasas, lipasa y cutinasas, que participan en el proceso de infección siendo segregadas por el hongo para degradar la cutícula vegetal y así poder penetrar e ingresar a la planta (Hewitt 1998, Elad et al. 2004).

Fritz et al. (2003) trabajando con pirimetanil y *B. cinerea* detectaron una disminución importante en la cantidad de metionina producida por el hongo a partir de la aplicación del fungicida, al mismo tiempo que se incrementaba la cantidad acumulada de la enzima cistationina β -liasa que es precursor de la síntesis de metionina. Estos datos indicarían que pirimetanil inhibe la biosíntesis de metionina y sugieren que el objetivo primario podría ser la cistationina β -liasa. En cambio, diversos estudios enzimáticos con *B. cinerea*, revelaron sólo una débil inhibición de la enzima cistationina β -liasa por efecto de las anilopirimidinas (Fritz et al. 2003, Elad et al. 2004). Por esta razón, varios autores clasifican a los fungicidas de este grupo como de modo de acción indefinido (Hewitt 1998, Fritz 2003, Leroux et al. 2004).

2.2.2. Riesgo de desarrollar resistencia

La información acerca del riesgo de generación de resistencia genética por los diferentes fitopatógenos como consecuencia del uso de las anilopirimidinas para su control, es un elemento crucial en la evaluación y selección de medidas anti resistencia e influye directamente en el diseño y el éxito de las estrategias para evitarla (Moyano et al., 2004).

El Comité de Acción contra la Resistencia a Fungicidas, elaboró un diagrama que relaciona el riesgo de generación de resistencia ejercido entre el fungicida y el riesgo inherente por parte del patógeno. En el mismo se destaca que en una relación de interacción entre *B. cinerea* y un fungicida del grupo químico anilopirimidinas, el riesgo de generación de resistencia tiene un valor 6, que es uno de los más altos dentro de la escala FRAC (2005, ver anexo 3).

Los fungicidas pertenecientes al grupo: ciprodinil, mepanipirim y pirimetanil, son sustancias químicas estrechamente relacionadas entre sí, que poseen el mismo sitio de acción en el hongo. Como consecuencia, tiene lugar un tipo de resistencia, que es la cruzada, en donde una mutación afecta la sensibilidad a dos o más fungicidas debido a que estos presentan un modo de acción o estructura química similar. Es decir, dos fungicidas presentan resistencia cruzada si la mutación del mismo gen proporciona

resistencia a ambos. Entonces las cepas de hongos que presenten resistencia a una de las anilopirimidinas, presentarán también resistencia a los demás botricidas pertenecientes al grupo, por lo que al aplicar una anilopirimidina, se estarán seleccionando los individuos resistentes a cualquiera de ellas (Leroux et al., 2004).

En trabajos realizados por Fritz (2003) en los que se analizaron cepas de *B. cinerea* altamente resistentes a anilopirimidinas, se detectó un fenotipo que se denominó AniR1, que sugiere que un gen principal (Ani 1) proporciona resistencia frente a estos fungicidas generando dicho fenotipo y que este gen es segregado independientemente del gen que confiere resistencia a los fungicidas dicarboximidas. Esto reafirma la hipótesis de que el sitio de destino de las anilopirimidinas en el hongo, podría ser diferente del de las dicarboximidas, razón por la cual no se han detectado casos de resistencia cruzada entre ambos grupos de fungicidas y sugiere también que el mecanismo de resistencia a los puntos de acceso podría ser debido a una mutación en el gen Ani 1.

Por su lado, el Grupo de Trabajo de FRAC menciona que los casos de pérdida de sensibilidad a las anilopirimidinas detectados en *B. cinerea*, se han mantenido a baja frecuencia y el control ejercido de estos fungicidas sobre las enfermedades continúa siendo muy bueno después de doce años de uso comercial del producto. Con el objetivo de que estos productos no pierdan su eficacia de control a causa de su uso repetido, FRAC ha publicado varias normas para su correcta utilización que se han aplicado a lo largo de este período. Estas normas difieren de acuerdo con la enfermedad a tratar y el cultivo, pero el enfoque general es restringir el número de tratamientos que se aplicarán por cultivo y temporada (Brent y Hollomon, 2007a).

El propósito de la creación de pautas para el uso de productos que contienen anilopirimidinas es mantener la sensibilidad de los agentes patógenos y evitar pérdidas en cosechas debido al desarrollo de resistencia en las poblaciones de patógenos. Las recomendaciones son las siguientes:

- Cuando se realizan dos tratamientos por temporada, el número de aplicaciones de productos que contienen anilopirimidinas se limita a uno.
- En casos donde se realizan hasta seis tratamientos para el control de *Botrytis cinerea* por cultivo y temporada, un máximo de dos aplicaciones con anilopirimidinas es lo recomendado.
- En situaciones concretas, en que se llevan a cabo siete o más tratamientos contra *B. cinerea*, se debe utilizar por cultivo y estación un máximo de tres aplicaciones con anilopirimidinas y no más de dos aplicaciones consecutivas con dicho fungicida (FRAC, 2012a).

Otro punto importante y sobre el cual aún existen varias interrogantes, es sobre el efecto de la dosis de fungicida en la capacidad de seleccionar individuos resistentes en una población de patógenos. La mayoría de los estudios experimentales y los modelos matemáticos publicados muestran que el desarrollo de resistencia aumentó al incrementar las dosis de fungicidas aplicadas y que no hay evidencia de que una dosis más baja de producto pueda conducir a una mayor selección de individuos resistentes al fungicida (Van den Bosch et al., 2011).

Sin embargo, para algunos criterios de evaluación, el efecto nocivo de una dosis alta en la selección, es contrarrestado por el beneficio de la eficacia. En algunas circunstancias, la mayor eficacia lograda a dosis altas, puede disminuir el número de aplicaciones requeridas para lograr comercialmente un control aceptable (Van den Bosch et al., 2011).

2.2.3. Variación del comportamiento según el ambiente

Se han llevado a cabo diversos trabajos con el fin de determinar la efectividad de control de los fungicidas bajo diferentes condiciones ambientales, por ejemplo, Jalil et al. (1996) realizaron una investigación cuyo objetivo fue determinar el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la sensibilidad *in vitro* de *B. cinerea* a pirimetanil, cuantificado por el crecimiento del micelio. Estos autores observaron un efecto significativo de la composición del medio en la respuesta de *B. cinerea* a pirimetanil, presentando mayor efectividad *in vitro* en medios con un mínimo contenido de hidratos de carbono.

Estudios similares realizados *in vitro* con *B. cinerea* revelaron que las anilopirimidinas inhiben fuertemente la elongación del tubo germinativo pero los efectos sobre el crecimiento del micelio varían con la composición en nutrientes de los medios. En el mismo estudio, se constató que la fungitoxicidad fue generalmente baja en medios complejos, por ejemplo aquellos que contienen extracto de levadura. Este fenómeno parece estar relacionado con la capacidad del hongo para obtener nutrientes por métodos accesorios que evitan el modo de acción de anilopirimidinas (Elad et al., 2004).

Por otro lado, investigaciones realizadas a campo permitieron verificar que la molécula de pirimetanil es más persistente en ausencia de luz, oxígeno y agentes microbianos en el suelo. El orden de importancia de estos tres factores sobre la degradación es el siguiente: luz < actividad microbiana < oxígeno. Los productos de degradación identificados fueron: (1) ácido benzoico, (2) cis, cis-mucónico, (3) hidroxilo-4 ,6-dimetil-2-pirimidinamina, (4) N'-etil-N-hidroxi-formamidina y (5) 4,6-dimetil-2-piridinamina. Estos compuestos son diferentes a los reportados en la literatura para la degradación de pirimetanil en condiciones abióticas, por lo tanto el resultado

sugiere que la degradación del fungicida en el suelo es principalmente debido a factores bióticos (Vanni et al., 2006).

En otra investigación similar, realizada por Vanni y Fontana (2003), se determinó la fotodegradación de pirimetanil inducida por el complejo hierro (III) en soluciones acuosas, evaluándose el comportamiento de pirimetanil en las matrices reales. Los resultados experimentales muestran que la naturaleza de las soluciones tamponadas (acetato, fosfato y citrato) influye en la velocidad de desaparición de pirimetanil y en el caso de citrato, también en la clase de los subproductos formados durante el proceso de fotodegradación. Este proceso abiótico muestra la posibilidad de diferentes vías de degradación de pirimetanil en matrices ambientales como el suelo, las plantas y los productos alimenticios, donde el hierro es un componente natural.

Se ha constatado, que durante la irradiación (que simula la luz del sol) se produce una reacción fotoquímica redox de oxalato y citrato de Fe (III) que es una fuente importante de Fe (II) y de una serie de oxidantes tales como radicales H_2O_2 y O. El ataque de estos radicales O en las moléculas de los fungicidas produce numerosos productos de fotodegradación de los ingredientes activos. La vida media de los ingredientes activos cuando se someten a irradiación en presencia de hierro (III), se estima entre 28 y 79 min. Las tasas de fotodegradación en las mismas condiciones son: mepanipirim > ciprodinil > pirimetanil, sin embargo, los fotoproductos producidos y su cinética de formación son muy similares para los tres fungicidas (Anfossi et al., 2006).

2.2.4. Pirimetanil

El producto químico evaluado en este trabajo fue el fungicida pirimetanil, perteneciente al Grupo Químico Anilopirimidinas, su estructura química se detalla a continuación.

Fórmula química del producto: $C^{12} H^{13} N^3$

- IUPAC: N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)aniline
- CAS: 4,6-dimethyl-N-phenyl-2-pyrimidinamine (Modernel, 2009).

Su nombre comercial es **VENTHOS S.C.** Las presentaciones disponibles en el mercado corresponden a suspensiones concentradas para aplicación al follaje. Es compatible con la mayoría de los productos agroquímicos de uso común, excepto aquellos de reacción alcalina (URUGUAY. MGAP. SA, 2012).

2.3. METODOLOGÍA DE TRABAJO CON *BOTRYTIS* SP EN LABORATORIO

Para la realización de pruebas o estudios, las cepas de patógenos necesitan ser multiplicadas para inocular a los posibles huéspedes. En algunos casos es suficiente con obtener un aumento vegetativo, como cuando se desea incrementar la población de un hongo para infectar suelo con su micelio, pero hay hongos, como es el caso de *Botrytis cinerea*, que se diseminan o solo infectan por medio de sus esporas (French y Hebert, 1982).

En las inoculaciones artificiales de laboratorio, la condición del inóculo obtenido y de la planta huésped, tendrá una importante incidencia en el resultado final de la investigación. El inóculo debe mantenerse en estado virulento y agresivo y debe tomarse en cuenta que su aplicación en medios nutritivos y en cantidad excesiva puede ser poco representativo y no dar resultados que se correlacionen con lo que ocurre en la naturaleza (French y Hebert, 1982).

Estudios realizados con *Botrytis* sp. sugieren que el nivel de concentración de la suspensión de conidios y la presencia de suplementos nutricionales, no sólo pueden influir en las actividades previas a la penetración de esos conidios a los tejidos del huésped, sino también sobre la expresión de síntomas posteriores en el vegetal (Elad et al., 2004).

Por lo tanto, para evaluar el comportamiento de *B. cinerea* es importante escoger un medio de cultivo cuya composición optimice su desarrollo, para lograr un adecuado crecimiento y alta esporulación, obteniendo una suspensión de esporas viables con alta probabilidad de producir infección. A continuación se detallan las etapas a realizar para una correcta inoculación.

2.3.1. Desinfección del huésped

El objetivo de esta etapa es la eliminación o disminución de microorganismos no deseados y de sustancias que puedan interferir en los resultados finales de los experimentos. Cuando se trabaja con material vegetal siempre es conveniente realizar una limpieza de la superficie vegetal, manteniendo todas las precauciones posibles que eviten causar daño y/o alteraciones en las muestras (French y Hebert, 1982).

La planta hospedera de un patógeno siempre tiene otros microorganismos sobre su superficie, se mencionan a continuación en términos generales, los métodos útiles para evitarlos o disminuir su efecto:

- Lavar las muestras con agua potable corriente y aireada cuando el material esté muy sucio.

- Lavar en agua con detergente cuando es material difícil de mojar.
- Introducir muestras en alcohol etílico 70% para romper la tensión superficial y remojar luego en otro desinfectante.
- Hacer uso de la suspensión de propágulos del patógeno con el cual se trabajará para eliminar contaminantes que están en proporción mínima, es decir no preocuparse de eliminar al contaminante, sino diluirlo (French y Hebert, 1982).

Las técnicas de desinfección más usadas, señaladas por varios autores, consisten en sumergir las muestras vegetales en hipoclorito de sodio 1 % por unos minutos, en agua destilada, en bicloruro de mercurio por 1-2 minutos, realizar un frotado de las superficies con alcohol (French y Hebert 1982, Topolovec-Pintari y Cvjetkovi 2002, Moyano et al. 2004).

2.3.2. Factores de crecimiento e incubación

2.3.2.1. Medios nutritivos

Para obtener inóculo de *B. cinerea* de alta calidad y en cantidad suficiente, es necesario proporcionarle al hongo un medio con las condiciones necesarias, en el que pueda crecer y desarrollarse exitosamente sin presencia de otros microorganismos. Para ello se utilizan los medios de cultivo que son sustancias o soluciones que permite el desarrollo de microorganismos bajo condiciones artificiales. Los medios utilizados en micología deben contener los todos los nutrientes necesarios para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos, como son: carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc (Cañedo y Ames, 2004).

Para los hongos cultivables bajo condiciones artificiales, se pueden utilizar medios de diversas composiciones dependiendo siempre, del objetivo del trabajo. Como ejemplos de medios se citan: Agar Papa Dextrosa, Agar Agua, Fitolevadura, Agar Metil Peptona, Agar Malta, Medio Vogel (Cañedo y Ames 2004, Espinosa De Los Monteros 2006).

Sin embargo, a pesar de la gran variedad de medios de cultivo disponibles, el más ampliamente utilizado para la propagación de hongos, es el medio de Agar Papa Dextrosa (PDA), sirve para aislar todo tipo de hongos, logrando un alto crecimiento y esporulación (French y Hebert 1982, Cañedo y Ames 2004).

2.3.2.2. Temperatura y humedad

En diversos trabajos de investigación empleando cepas de *B. cinerea*, se menciona, que a temperaturas de incubación entre 18-24°C y bajo condiciones de alta humedad, se registra el crecimiento y desarrollo adecuado del hongo (Topolovec-Pintari y Cvjetkovi 2002, Moyano et al. 2004, Agrios 2008).

2.3.2.3. Luz

En cuanto a las necesidades lumínicas que presentan diversos hongos, cabe señalar que French y Hebert (1982) mencionan que muchos de estos, incluida *B. cinerea*, esporulan poco o nada en ausencia de luz y recomiendan exponerlos a un fotoperiodo normal en un laboratorio con ventanas amplias, pero evitando la incidencia de radiación solar directa. En caso de emplear luz artificial, conviene probar primero un fotoperiodo de aproximadamente 8 a 10 horas, y luego aumentarlo hasta luz continua.

Sin embargo, trabajos más recientes, indican que la incubación de *B. cinerea* bajo condiciones de oscuridad permite obtener mayor esporulación y mejor calidad de inóculo (Topolovec-Pintari y Cvjetkovi 2002, Moyano et al. 2004, Espinosa de los Monteros 2006).

2.3.2.4. pH

El pH del medio de cultivo en el cuál se vaya a introducir *Botrytis cinerea*, debe ser ligeramente ácido con un rango de valores de pH entre 6 – 6.3, para facilitar su crecimiento y desarrollo e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos indeseados (Cañedo y Ames, 2004).

2.3.3. Inoculación

2.3.3.1 Métodos

La aplicación del patógeno al hospedante puede ser realizada a través de técnicas o métodos diferentes, a continuación se mencionan los más utilizados según French y Hebert (1982):

- Absorción del patógeno por el hospedante: en ésta técnica los patógenos ingresan al material vegetal a través de los haces vasculares cortados transversalmente a propósito o cuando ocurren daños durante el trasplante de plantas, también pueden ser suspendidos los microorganismos en el agua de riego para de esta forma ser absorbidos por las raíces de la planta.

- Vaciado de los propágulos al suelo: ésta técnica es para patógenos que pueden penetrar al hospedante a través de los órganos subterráneos, sin necesidad de heridas. Se deben verter cantidades iguales de inóculo uniformizado al suelo en cada maceta.
- Incorporación al suelo: puede realizarse antes de sembrar un cultivo, o alrededor de órganos descubiertos por remoción momentánea del suelo.
- Contacto: consiste en poner en contacto el huésped con el patógeno, se cortan porciones del hongo en medio agar y se colocan junto al tallo de la planta, también se puede impregnar algodón con suspensiones de esporas que se colocan en la superficie de las hojas.
- Frotación: consiste en mojar los dedos o un hisopo en una suspensión de propágulos y se frota la superficie vegetal.
- Presión: es la introducción por presión del patógeno a partes inaccesibles de la planta, por ejemplo a través de estomas.
- Inserción: en este caso se inserta el inóculo en el interior del vegetal, luego de realizar una apertura con un cuchillo estéril, se cortan los dos lados de un triángulo de 1-2 cm y se levanta la lengua formada, se inserta el inóculo y se cierra con una cinta adhesiva o vaselina.
- Inyección: se inyecta a través de jeringas o agujas, suspensiones de esporas o bacterias entre los tejidos vegetales.
- Punción: la técnica consiste en que un artefacto punzante, como una aguja, permita abrir el camino al inóculo que se coloque sobre una herida, es más eficaz colocar primero el inóculo y luego punzar la planta a través de éste (French y Hebert, 1982).

Para el caso de especies del género *Botrytis*, especialmente cuando se trabaja con *B. cinerea*, en casi todos los experimentos la inoculación se realiza con suspensiones de conidios aplicados a heridas recientes sobre el tejido vegetal. De este modo se facilita el ingreso del patógeno a la planta y por ende el establecimiento de la infección (Elad et al., 2004).

2.3.3.2. Concentración de la suspensión de esporas

Para lograr la expresión de los síntomas causados por *Botrytis cinerea* en el material vegetal luego de la inoculación, es necesario, además de facilitar el ingreso del patógeno al huésped, que las suspensiones de conidios utilizadas contengan un alto número de los mismos, se consideran valores de aproximadamente 1×10^3 a 1×10^6 conidios por mililitro de medio diluyente, que es generalmente agua destilada estéril (Topolovec-Pintari y Cvjetkovi 2002, Elad et al. 2004, Moyano et al. 2004, Espinosa de los Monteros 2006).

2.3.3.3. Suplementación

En numerosos ensayos realizados con *Botrytis* sp., se menciona que las suspensiones de conidios obtenidas son suplementadas con nutrientes, especialmente azúcares, con el fin de incrementar las posibilidades de una penetración exitosa de patógeno en el tejido vegetal. De lo contrario pueden originarse situaciones de resistencia por parte del huésped al ingreso del patógeno, que impida el establecimiento de la infección (Elad et al., 2004). Algunos inconvenientes han sido mencionados por varios autores, los que señalan que para lograr una infección artificial y posterior desarrollo de la enfermedad en varios hospedantes fue esencial la adición de glucosa al inoculo, requerimiento que generalmente no es necesario para otros hongos (Edlich et al., citados por Martínez et al., 2004).

Por su lado Holz et al. (2004) menciona que en diversas investigaciones la adición de nutrientes exógenos al inoculo incrementó la frecuencia de formación de lesiones sobre el material vegetal. En esos experimentos también se señala que con iguales condiciones de trabajo, usando muestras de hojas de cebolla, pepino, fresa, habas, cotiledones de pepino, frutos de ciruelo y nectarina permanecieron totalmente asintomáticas cuando el inoculo de *B. cinerea* se elaboró solamente con agua destilada estéril, sin previa adición de azúcares.

2.3.4 Evaluación

Las técnicas utilizadas para la evaluación del crecimiento y desarrollo de *B. cinerea*, van a depender principalmente del objetivo perseguido en el trabajo. Por ejemplo, si se necesita obtener un determinado número de conidios por volumen para la elaboración de suspensiones de esporas, se debe utilizar un hematocímetro o cámara de Neubauer, que permite determinar el número de conidios presentes en un determinado volumen de diluyente (Cañedo y Ames, 2004).

Por otro lado, si es necesario realizar una caracterización fisiológica de los hongos, se debe evaluar el rendimiento en número de conidios por volumen y la viabilidad de los mismos, como porcentaje de germinación, esto se logra sembrando una suspensión de concentración conocida de conidios en una placa de petri con medio de cultivo adecuado, se deja incubar por 15 días, bajo temperaturas en el entorno de 20°C y luego se procede a contabilizar las conidios en cámara de Neubauer (Cañedo y Ames, 2004).

Otra técnica empleada comúnmente para evaluar la viabilidad de los conidios, es la observación microscópica de la secuencia de eventos que acompañan a la germinación de los mismos. La colocación de suspensiones de conidios en forma de gotitas sobre huéspedes susceptibles, reveló que la germinación se produce rápidamente,

desarrollando tubos germinales que sobresalen de la estructura de la espora, dentro de 1-3 h después de la inoculación (Holz et al., 2004).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES UTILIZADOS

3.1.1. Aislamientos de *Botrytis cinerea*

Para la realización de los ensayos se utilizaron aislamientos pertenecientes al Proyecto “Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay”, llevado a cabo en la Unidad de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Estos aislamientos fueron obtenidos a partir de material vegetal infectado por *B. cinerea* extraído de diversos cultivos en diferentes zonas del país. Los mismos se encontraban conservados en el laboratorio en el freezer bajo temperaturas de -20° C sobre papel de filtro.

Se seleccionaron aislamientos contrastantes en cuanto a los niveles de concentración mínima inhibitoria determinados para pirimetanil en ppm.

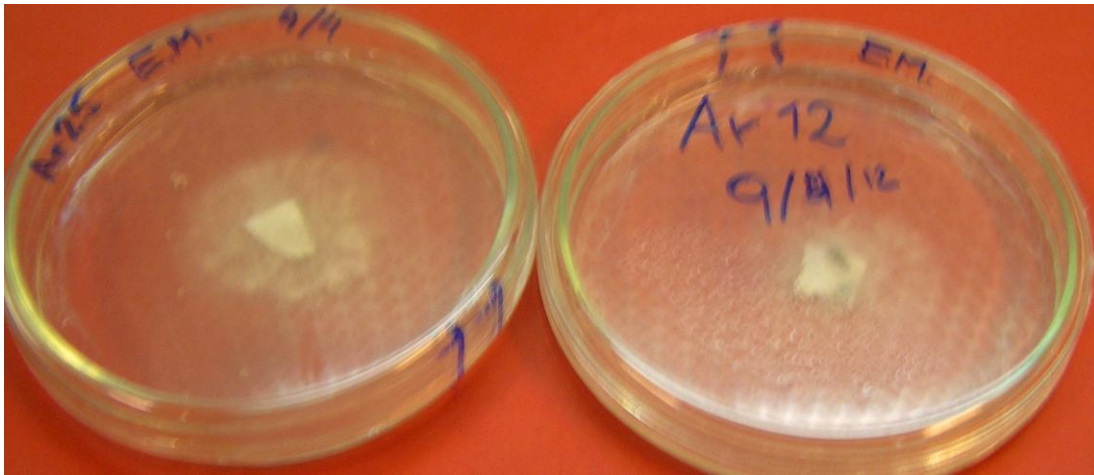
Cuadro 3. Aislamientos de *Botrytis cinerea* con diferentes niveles de CIM utilizados en el ensayo

Aislamiento	Hospedero	Zona	CIM a pirimetanil
T 21	Tomate	Sur	<1
T 23	Tomate	Sur	>8
T 67	Tomate	Sur	>8
Fr 24	Frutilla	Sur	>8
Fr 133	Frutilla	Norte	>8
Fr 121	Frutilla	Norte	<0,5
Fr 138	Frutilla	Norte	<0,5
Ar 12	Arandano	Sur	>8
Ar 6	Arandano	Sur	>8
Ar 19	Arandano	Sur	>8
E 2	Eucalipto	Sur	<0,5
Pic 15	Vid	Sur	<0.5
Pic 22	Vid	Sur	>8

Para la realización de los repiques se tomó un pequeño trozo del papel que contenía el hongo, aproximadamente un centímetro cuadrado y se colocó en una placa de Petri con medio de cultivo PDA.

Las placas se sellaron con papel film para evitar la posible contaminación y se mantuvieron en incubadora a 24°C hasta que el hongo presentó desarrollo en toda la placa produciendo esporulación. El tiempo necesario para ello fue de entre 15 y 20 días.

Figura 2. Repiques de aislamientos originales de *B. cinerea*



3.1.2. Especie vegetal utilizada como huésped

Como ya se mencionó anteriormente, *Botrytis cinerea* tiene la capacidad de infectar numerosos cultivos, en este trabajo la especie elegida como huésped para el desarrollo de la enfermedad fue el tomate, *Solanum lycopersicum*, perteneciente a las familia de las Solanáceas.

La elección de esta especie tuvo varias razones, primero el tomate es un cultivo de gran importancia en nuestro país que se cultiva en diversas zonas del mismo y es atacado frecuentemente por *B. cinerea*. También, es una especie que se cultiva fácilmente en invernáculo, es de fácil manipulación dado su tamaño y presenta ciclos cortos lo que permite la obtención de material vegetal en poco tiempo.

El material utilizado para realizar los ensayos fueron hojas desprendidas de plantas de tomate de la variedad Marglobe, sembradas en almácigos el día 30 de marzo, para los mismos se utilizó sustrato esterilizado en autoclave y el 4 de junio se trasplantaron a macetas utilizando tierra no esterilizada. El tiempo transcurrido luego de la siembra hasta la obtención de una cantidad suficiente de hojas a un tamaño adecuado para la realización de los ensayos fue de aproximadamente 2 meses y medio. Las plantas se mantuvieron siempre bajo condiciones de invernáculo. Aunque no se aplicaron plaguicidas ni fungicidas, las plantas se mantuvieron sanas.

3.2. ENSAYO DE METODOLOGÍA

Con anterioridad a la realización de los ensayos se llevó a cabo una inoculación prueba con el objetivo de ajustar la metodología del procedimiento.

Se utilizó para dicha prueba un repique de *B. cinerea* del aislamiento Fr 121 que corresponde a frutilla, el cuál había sido mantenido en incubadora a 24°C aproximadamente, desde su elaboración semanas antes y que ya mostraba esporulación.

3.2.1. Procedimiento

Se colocaron con pipeta, 3 mL de agua destilada estéril en la placa de petri que poseía el hongo, se frotó suavemente con rastrillo de vidrio esterilizado para desprender los conidios que pudieran estar presentes en el micelio y se vertió el líquido resultante en un vaso de bohemia. Luego se observó al microscopio para verificar la presencia de esporas. Al comprobar positivamente la presencia de esporas en la suspensión se procedió a la preparación del material vegetal.

Se desprendieron dos hojas trifoliadas de las plantas de tomate cultivadas, se desinfectaron superficialmente con un algodón humedecido con alcohol 70% y se les efectuaron heridas con aguja estéril en dos folíolos de una de las hojas y una herida en un solo folíolo de la otra hoja.

Se colocó una gota de 20 ul de la suspensión de $0,5 * 10^5$ esporas por ml en el centro de cada foliolo tanto en los que tenían herida como en los sanos. Posteriormente se introdujeron las hojas en placas de petri en condiciones de cámara húmeda para favorecer el desarrollo del hongo, manteniéndose a temperatura ambiente. Se realizó una observación diaria de los cambios ocurridos sobre la superficie vegetal.

3.3. ENSAYO DE SENSIBILIDAD A PIRIMETANIL

Los resultados obtenidos en los ensayos de prueba realizados previamente permitieron ajustar la metodología del trabajo. A continuación se detalla el procedimiento elegido.

3.3.1. Elaboración de la suspensión de esporas

Una vez que los repiques realizados anteriormente presentaban señales de esporulación, se procedió a elaborar las suspensiones de esporas de *Botrytis cinerea*, para ello se utilizó agua destilada estéril que contenía 3% de glucosa.

Para poder observar las diferencias en el comportamiento de los hongos con diferente sensibilidad a pirimetanil, se elaboró una suspensión de esporas de cada aislamiento. Procediendo de la siguiente manera: se colocaron 2 ml de agua destilada estéril en cada placa y se frotó suavemente con un rastrillo de vidrio para desprender las esporas del micelio, se colocó el líquido resultante en un vaso de bohemia, luego se agregó 1 ml de agua destilada estéril en la misma placa para enjuagar vertiéndose el líquido también en el vaso.

Una vez obtenida la suspensión se procedió a la determinación de su concentración. La concentración final seleccionada, según bibliografía, fue de $1 * 10^6$ esporas por ml.

Se contabilizaron las esporas bajo microscopio utilizando la cámara de Neubauer y se llevó a la concentración deseada mediante diluciones.

3.3.2. Preparación del material vegetal

Cuando existían una cantidad suficiente de hojas de un tamaño adecuado se desprendieron y se sometieron a un proceso de desinfección, que consistió en sumergirlas en un baño con hipoclorito de sodio al 1 % por 1 minuto y dos enjuagues con agua destilada estéril con un minuto de duración cada uno.

A continuación, se colocó en el pecíolo de cada hoja un trozo de algodón en forma envolvente, el cual fue humedecido con 2 ml de agua destilada, con el fin de evitar la deshidratación de las mismas.

Las hojas se dejaron secar durante 24 horas y luego se procedió a realizar cada uno de los diferentes tratamientos.

3.3.3. Aplicación de tratamientos

Se realizaron tres tratamientos con cada aislamiento:

1. Testigo, pulverización de las hojas con agua destilada estéril.
2. Aplicación de la mitad de la dosis de pirimetanil recomendada en la etiqueta, 125 cc/ 100 lts de agua.
3. Aplicación de dosis total recomendada, 250cc / 100lts de agua.

Cada tratamiento incluyó entre 4 y 5 repeticiones. Cada repetición constó de una placa que contenía un folíolo de tomate.

Se dejaron secar las hojas nuevamente por unas horas y se colocaron en placas de petri de plástico.

3.3.4. Inoculación

Una vez secas, se inocularon con una gota 20 µl de la suspensión obtenida de cada aislamiento, produciéndose una pequeña herida en el centro de la gota con una aguja estéril.

3.3.5. Incubación

Las hojas se colocaron en placas de petri, selladas con film y se incubaron en cámara húmeda a 24°C durante 7 días.

3.3.6. Evaluación

El avance de *B. cinerea* sobre la superficie del folíolo de tomate, se determinó midiendo el diámetro de la lesión en centímetros, un diámetro igual a 5, se consideró para las hojas afectadas en su totalidad por la enfermedad, ya que éste valor correspondía aproximadamente con el tamaño promedio de todos los folíolos utilizados en el ensayo.

La toma de datos comenzó a las 48 hs. luego de la inoculación, el crecimiento de las lesiones se evaluó cada 24 hs, durante 5 días consecutivos. Las medidas obtenidas del diámetro de la lesión fueron usadas para calcular el crecimiento promedio en los días de evaluación.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para estudiar el efecto de la concentración mínima inhibitoria a pirimetanil (CIM) de los aislamientos y el de los tratamientos de aplicación de fungicida, a dosis recomendada en la etiqueta del producto 2.5cc/lit y a la mitad de la misma 1.25cc/lit, sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* a los 7 días post inoculación y sobre el control relativo, se ajustaron modelos lineales. Dichos modelos consideraron el efecto de la concentración mínima inhibitoria a pirimetanil, el efecto de los aislamientos conjuntamente con la CIM, el efecto de los tratamientos y las interacciones de la CIM por tratamiento y tratamiento por aislamiento dentro de la CIM.

Las medias de los efectos significativos fueron comparadas usando el test de Tukey al 5%. Se usó el procedimiento estadístico SAS versión 9.2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ENSAYO DE METODOLOGÍA

El ensayo preliminar permitió ajustar la metodología empleada. En esta prueba se observaron al tercer día de la inoculación, pequeñas manchas necróticas irregulares en toda la superficie de las hojas independientes de los puntos de inoculación y de las heridas realizadas.

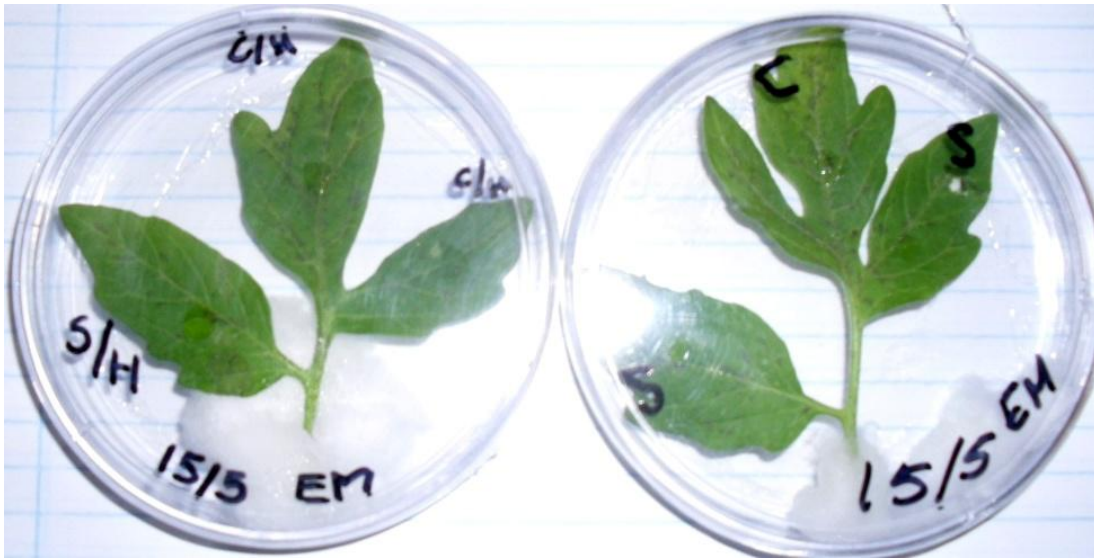
Se llegó a la conclusión de que estas manchas necróticas se debieron al quemado de la superficie foliar por el uso de alcohol 70% en el proceso de desinfección, por lo que en futuros procedimientos se modificó esta metodología.

Al séptimo día, pos inoculación, las hojas con heridas presentaron mayor desarrollo de la enfermedad, detectándose en una de ellas la presencia de micelio.

El mayor desarrollo de la enfermedad en los folíolos con heridas con respecto a los sanos, se debió probablemente a la mayor facilidad para el hongo para ingresar al tejido vegetal.

Según lo reportado por Elad et al. (2004) en casi todos los experimentos realizados con especies del género *Botrytis*, especialmente con *B. cinerea*, las inoculaciones de conidios se realizan a través de heridas recientes, que facilitan el establecimiento de la infección.

Figura 3. Imagen tomada dos días luego de la inoculación prueba: (placa A) hoja con herida (C/H) en dos folíolos, (placa B) hoja con herida en un solo folíolo (C)



A

B

Figura 4. Imagen tomada al séptimo día luego de la inoculación



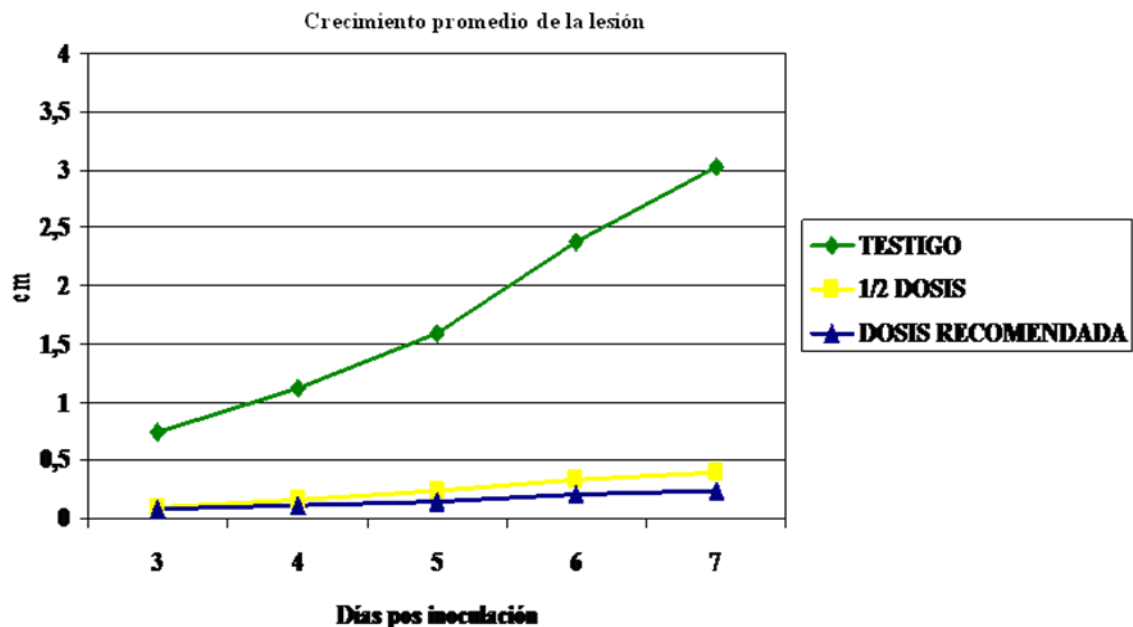
4.2. RESULTADOS GENERALES DEL ENSAYO CON AISLAMIENTOS CON DIFERENTE CIM A PIRIMETANIL

4.2.1. Efecto del fungicida a diferente dosis sobre el desarrollo de la lesión causada por *Botrytis cinerea*

El séptimo día luego de la inoculación, entre el 40% y 75% de las repeticiones testigos correspondientes a los aislamientos Fr 24, Fr 121, Fr 138, Ar 19, Ar 6 y T 67, presentaban valores máximos de avance de la enfermedad, es decir que la lesión causada por el hongo afectaba totalmente el foliolo de tomate. Además, todas las hojas testigos presentaron un mayor y progresivo avance de la enfermedad con el paso de los días (ver anexo 4).

Ninguna repetición de los tratamientos que incluían la aplicación del fungicida a diferentes dosis, llegó al valor máximo de avance de la enfermedad y tampoco se encontraron diferencias entre ambas dosis en cuanto al desarrollo y avance de la enfermedad (ver cuadro 4).

Figura 5. Evolución del diámetro medio de la lesión según tratamiento

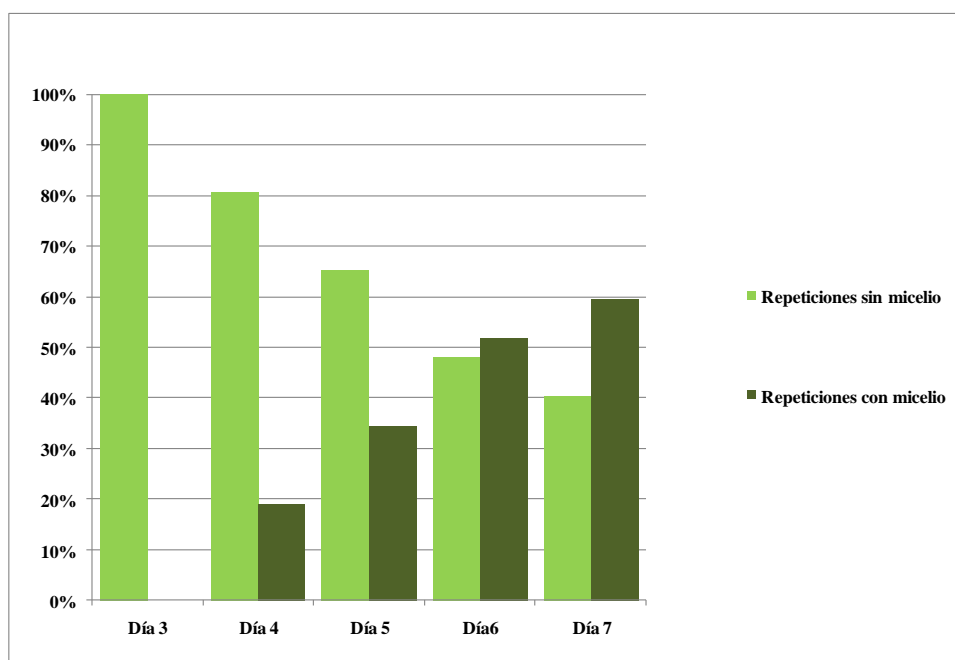


4.2.2. Control del fungicida sobre el desarrollo de micelio y/o esporulación

Con respecto al control del fungicida sobre el crecimiento de micelio y esporulación, se constató 100% de control tanto a la dosis recomendada para el producto, como a la mitad de la misma durante los siete días posteriores a la inoculación, detectándose presencia de micelio solo en el tratamiento testigo.

Se observó la presencia de micelio a partir del cuarto día pos inoculación en los aislamientos T 67, AR 6 y FR 24 y a partir del sexto día luego de la inoculación se detectó que al menos una repetición del tratamiento testigo desarrolló micelio en el 100 % de los aislamientos (figura 6).

Figura 6. Evolución del porcentaje de repeticiones testigo con presencia de micelio*



* No se observó micelio en ninguna de las parcelas con fungicida.

Este resultado concuerda con los de Petsikos-Panayotarou et al. (2002) quienes mencionan que las anilopirimidinas pirimetanil y ciprodinil, inhibieron el crecimiento micelial en cepas de *Botrytis cinerea* con diferentes niveles de sensibilidad a los fungicidas aún en bajas concentraciones de producto.

Estos resultados indican una alta efectividad por parte del fungicida para evitar el desarrollo de micelio y esporulación, al menos durante los primeros siete días luego

de la infección, lo que disminuye la capacidad del hongo para dispersarse e infectar otras plantas enlenteciendo el desarrollo de la epidemia.

4.2.3. Desarrollo de la lesión según la sensibilidad *in vitro* a pirimetanil

Se analizó la posible relación entre la sensibilidad *in vitro* a pirimetanil y el desarrollo de la enfermedad cuantificado de dos maneras distintas: diámetro de la lesión y porcentaje de control.

4.2.3.1. Diámetro de la lesión

En las figuras 7 y 8 se muestra la evolución en el tiempo del diámetro de la lesión causada por la enfermedad como valores promedio en dos grupos de aislamientos con distinta concentración inhibitoria mínima al fungicida, los aislamientos utilizados se detallan en el cuadro 3 de la sección materiales y métodos.

Figura 7. Crecimiento promedio de aislamientos con CIM ≤ 1 mg/l desde el tercer hasta el séptimo día pos inoculación

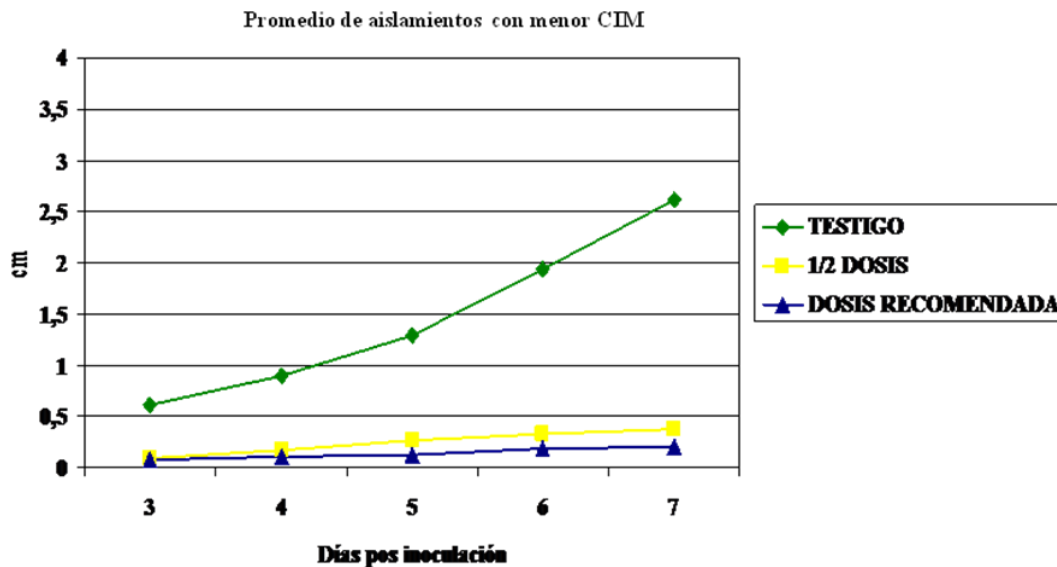
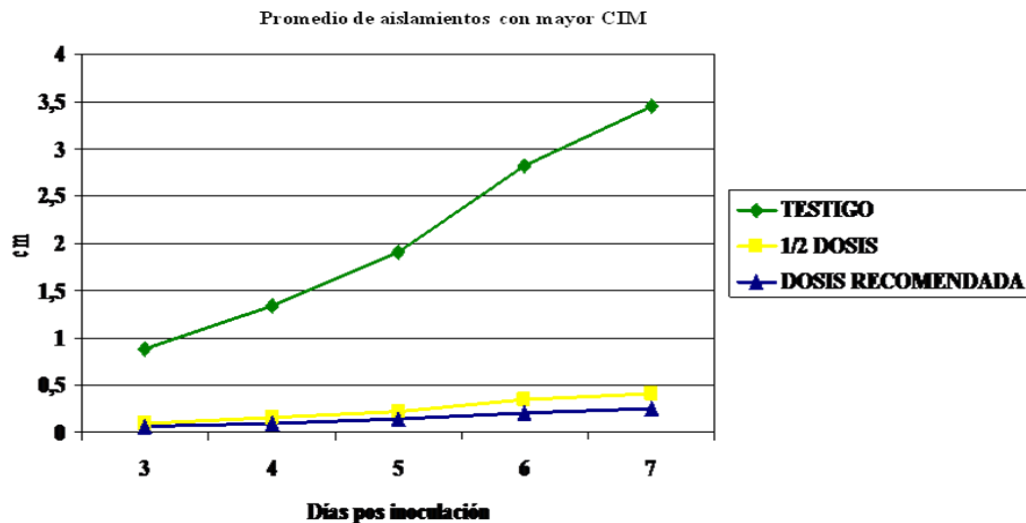


Figura 8. Crecimiento promedio de aislamientos con CIM ≥ 8 mg/l desde el tercer hasta el séptimo día pos inoculación



Se puede apreciar que en el tratamiento testigo el crecimiento promedio de la lesión fue mayor en los aislamientos con alta CIM a pirimetanil llegando a un valor promedio de 3,5 cm de diámetro el último día de registro, mientras que los aislamientos con baja CIM presentaron un valor promedio de 2,6 cm. No se puede afirmar que dichas diferencias en el crecimiento promedio de la lesión con respecto al nivel de CIM se deban a que los aislamientos menos sensibles tengan una mayor capacidad de desarrollo, dado que los dos grupos contrastantes en cuanto su nivel de CIM no resultaron ser homogéneos. Si bien al inicio del trabajo se seleccionaron dos aislamientos de cada especie vegetal con CIM bajo y otros dos con CIM alto, en el transcurso del trabajo varios aislamientos debieron ser excluidos por baja performance y/o ausencia de esporulación, finalmente se trabajó con cinco aislamientos con CIM ≤ 1 mg/l y ocho con CIM ≥ 8 mg/l a pirimetanil y la distribución entre los huéspedes no fue homogénea (ver cuadro 3).

Sin embargo, en los tratamientos que incluían aplicación de fungicida no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento promedio de los grupos de aislamientos con alta y baja sensibilidad a pirimetanil ni entre la aplicación de la dosis recomendada por el producto en la etiqueta y la mitad de la misma (Cuadro 5).

Una similitud en la habilidad competitiva entre los aislamientos de *B. cinerea* con diferentes niveles de sensibilidad a pirimetanil indicaría que la resistencia a dicho fungicida y por ende a los demás pertenecientes al grupo de las anilopirimidinas, es una característica estable (Moyano et al., 2004). El número de aislamientos probados en el

presente trabajo y la metodología empleada no fue la adecuada para afirmar si existen o no diferencias en la habilidad competitiva de los aislamientos.

Para la realización del análisis estadístico, se tomaron como referencia los datos obtenidos de los ensayos el séptimo día pos inoculación. Mediante este análisis no se constataron diferencias significativas en cuanto al desarrollo del hongo sobre las hojas de tomate entre los tratamientos que incluían la aplicación de la dosis de fungicida recomendada en la etiqueta y la mitad de la misma, pero sí, como era esperable, entre éstos y el tratamiento testigo (cuadro 4). En este último se registró mayor diámetro de las lesiones con respecto a los tratamientos con fungicida, presentando, en la mayoría de los casos, un incremento constante a lo largo del período de incubación (ver anexo 4).

Cuadro 4. Diámetro medio de la lesión según tratamiento 7 días pos inoculación.

Tratamientos 2	Crecimiento promedio	Error estándar	Letra 1
T	3.0706	0.1067	a
½ F	0.3944	0.1067	b
F	0.2356	0.1067	b

1 Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0,05$).

2 Tratamientos: T = testigo sin tratar, ½ F = fungicida aplicado a mitad de dosis de etiqueta y F = fungicida aplicado a la dosis de etiqueta (2,5cc/l).

El hecho de que el control ejercido sobre la enfermedad, al aplicar la dosis de fungicida recomendada y la mitad de la misma no hayan presentado diferencias, puede deberse a que bajo las condiciones controladas de laboratorio, en las cuales se llevó a cabo el ensayo, no estén presentes factores que degraden la estructura química del producto como sucede en condiciones de campo, por lo que, menores dosis del fungicida tienen igual efectividad de control a las recomendadas.

Los resultados obtenidos por Vanni et al. (2006) apoyan esta hipótesis, ya que demostraron que las moléculas de pirimentanil presentes en el suelo, son más persistentes en ausencia de luz, oxígeno y actividad microbiana. Dichos autores sugieren que la degradación en el suelo es principalmente a causa de factores bióticos.

Además, en una investigación similar, Vanni y Fontana (2003), Anfossi et al. (2006) determinaron la existencia de una fotodegradación de los fungicidas pertenecientes a las anilopirimidinas inducida por el complejo hierro (III), en solución acuosa en el suelo. El proceso de foto degradación abiótico mostró la existencia de diferentes vías de degradación para pirimetanil en matrices ambientales naturales como el suelo, las plantas y los productos alimenticios, donde el hierro es un componente natural de las mismas. Todos estos procesos no tuvieron lugar ni tiempo, en las condiciones en las que se realizaron los ensayos para este trabajo.

Debido a esto, serán necesarios otros trabajos de investigación que permitan comparar el control logrado en plantas enteras, cultivadas en condiciones de campo, tratadas con diferentes dosis de pirimetanil e inoculadas con aislamientos de *B. cinerea* con diferente sensibilidad al fungicida determinada en el laboratorio, con el objetivo de estimar el significado de los ensayos *in vitro* sobre las posibilidades de control a campo (Foster y Staub, 1996).

Por otro lado, los resultados obtenidos de igual nivel de control de la enfermedad a ambas dosis de fungicida, abre la puerta a la posibilidad de utilizar dosis menores del producto para controlar al patógeno. Estudios recientes sugieren que la aplicación de dosis altas aumentaría la velocidad a la que los individuos desarrollan resistencia a los fungicidas (Van den Bosch et al., 2011).

Sin embargo, se debe considerar que una dosis elevada de producto puede ser necesaria para obtener un control más efectivo, en las situaciones cuando se trabaja con cultivares susceptibles, o en condiciones de alto nivel de enfermedad, también cuando el producto ha perdido eficacia a causa de una disminución de sensibilidad por parte de los individuos y la dosis debe ser incrementada para mantener un control efectivo. También es importante destacar que la mayor eficacia lograda a dosis altas del producto, puede disminuir el número de aplicaciones requeridas para lograr un control aceptable (Van den Bosch et al., 2011).

Cuadro 5. Diámetro promedio de las lesiones a los 7 días pos inoculación según nivel de CIM y tratamiento

CIM₂	Tratamiento₃	Promedio	Error estándar	Letra₁
Alta	T	3.5213	0.1297	a
Baja	T	2.6200	0.1694	b
Alta	½ F	0.4119	0.1297	c
Baja	½ F	0.3770	0.1694	c
Alta	F	0.2681	0.1297	c
Baja	F	0.2030	0.1694	c

1 Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0,05$).

2 CIM Alta ≥ 8 mg/l, Baja ≤ 1 mg/l.

3 Tratamientos: T = testigo sin tratar, ½ F = fungicida aplicado a mitad de dosis de etiqueta y F = fungicida aplicado a la dosis de etiqueta (2,5cc/l)

4.2.3.2. Control ejercido *in vivo* de pirimetanil sobre la enfermedad

Para determinar el control de la enfermedad obtenido por el fungicida, se consideró como valor de base o de referencia el avance de la enfermedad en el tratamiento testigo desde el tercer hasta el séptimo día pos inoculación. El avance de la enfermedad sobre la hoja se refiere al crecimiento del diámetro de la lesión, en centímetros, producida por *B. cinerea* en dicho lapso de tiempo.

Se detectaron valores de control relativamente altos entre 79,3 y 92.8% para ambos grupos de aislamientos tanto los de alta como los de baja sensibilidad a pirimetanil (cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de control ejercido por pirimetanil sobre la enfermedad causada por *B. cinerea*, a diferente dosis

Porcentaje de control de pirimetanil en aislamientos con valor de CIM $\leq 1\text{mg/l}^*$					
	3 día	4 día	5 día	6 día	7 día
Mitad de dosis (1.25cc/l)	84	81	79,3	83,3	85,6
Dosis total (2.5cc/l)	86	87,6	90	90	92,1
Porcentaje de control de pirimetanil en aislamientos con valor de CIM $\geq 8\text{mg/l}^*$					
Mitad de dosis (1.25cc/l)	89,5	88,8	88,4	88	88,2
Dosis total (2.5cc/l)	93,2	92,7	92,2	92,8	92,6

* Como porcentaje de reducción del diámetro de lesiones frente al testigo sin tratar

Se realizó un análisis estadístico de las variables valor de CIM a pirimetanil de los aislamientos y del diámetro de la lesión en centímetros medido al 7° día pos-inoculación, determinándose que no existen diferencias significativas en el control ejercido por pirimetanil sobre la enfermedad, en los aislamientos con mayor o menor concentración mínima inhibitoria a dicho fungicida (cuadro 7).

Es decir, que las diferencias en sensibilidad al fungicida detectadas anteriormente en ensayos *in vitro*, no fueron confirmadas en los ensayos *in vivo*.

Cuadro 7. Control relativo ejercido por el fungicida sobre el desarrollo de la enfermedad según el nivel de CIM a pirimetanil de los aislamientos

CIM 1	Promedio	Error estándar	Letra 2
Baja	0.8968	0.01651	a
Alta	0.8934	0.01264	a

1 CIM Alta $\geq 8\text{mg/l}$, Baja $\leq 1\text{mg/l}$.

2 Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos concuerdan con los presentados por Foster y Staub (1996), Topolovec-Pintari et al. (2002) quienes afirman que el desarrollo de resistencia al fungicida pirimetanil, detectada en aislamientos de *B. cinerea* en ensayos *in vitro* no pudo ser confirmada *in vivo*.

Sin embargo, Moyano et al. (2004) en estudios similares, encontraron una correspondencia entre la resistencia determinada *in vitro* para *B. cinerea*, con la ausencia de control con anilopirimidinas *in vivo*. Dicho autor señala también, que la medición de los cambios de sensibilidad en *B. cinerea* a las anilopirimidinas *in vitro* ha mostrado varios problemas, como confiabilidad y que la reproducibilidad de los resultados depende de los medios, temperatura, tiempo de incubación y de los métodos de medición utilizados para evaluar el crecimiento de los aislamientos estudiados.

Con respecto a lo anterior, en estudios realizados por Jalil et al. (1997) se demostró la existencia de un efecto significativo de la composición del medio, sobre la respuesta de *B. cinerea in vitro* a pirimetanil, presentando dicho fungicida, más efectividad de control *in vitro* en medios con un mínimo contenido de hidratos de carbono. En consecuencia, es importante definir el medio de cultivo antes de estudiar la posible resistencia de *B. cinerea* a este fungicida.

Esto señala que el comportamiento de *B. cinerea in vitro* y por lo tanto su respuesta frente a los productos químicos varía con la composición del medio de cultivo en el que se encuentre, de las condiciones proporcionadas para su crecimiento y desarrollo, así como también de la especie vegetal utilizada como huésped, pudiendo ser este punto, una causa de los diferentes resultados obtenidos entre autores.

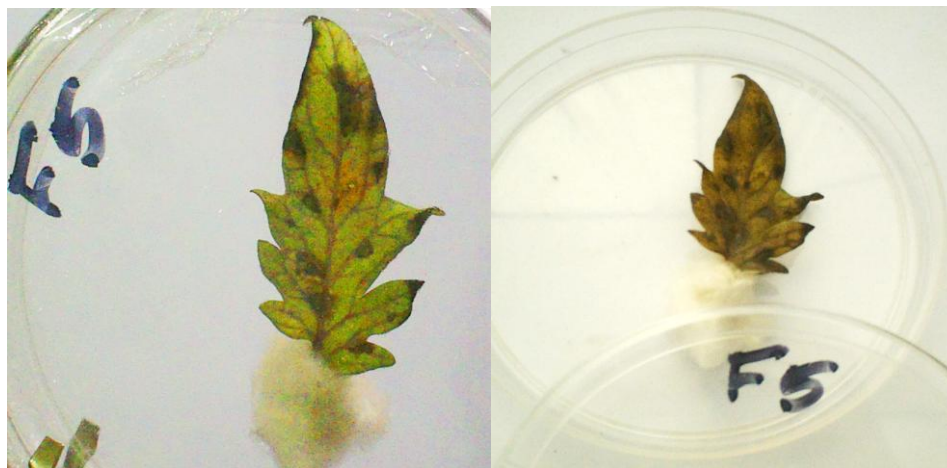
Si bien *B. cinerea* presenta un alto riesgo de generación de resistencia a los fungicidas del grupo químico anilopirimidinas, como se menciono anteriormente en este trabajo no se detectaron diferencias significativas en el comportamiento de los aislamientos con diferente sensibilidad a pirimetanil *in vivo*, lo que indica que no hubo pérdida de efectividad de dicho fungicida en el control de la enfermedad. Esto concuerda con lo mencionado por el Grupo de Trabajo de FRAC, en que los casos de pérdida de sensibilidad a pirimetanil detectados en *B. cinerea*, se han mantenido a baja frecuencia y el control ejercido de estos fungicidas sobre las enfermedades continúa siendo muy bueno después de doce años de uso comercial del producto.

4.2.4. FITOTOXICIDAD

Durante los ensayos, se observaron en algunas de las hojas en los tratamientos en que se aplicó el fungicida manchas irregulares de color marrón oscuro.

Estos daños sólo se observaron en hojas tratadas con el fungicida, por lo que se atribuyen al producto. Deterioraron totalmente la hoja en pocos días lo que hizo muy dificultosa la toma de datos, como consecuencia debieron repetirse los ensayos que presentaron mayores prejuicios. En la figura 9 se muestra una hoja con el daño mencionado

Figura 9. Folíolos de tomate con daños de fitotoxicidad causado por la aplicación de pirimetanil.



La información acerca de las características del producto, menciona que en condiciones de humedad relativa elevada en el ambiente, con valores entre 80 - 100%, Venthos es propenso a producir manchas marrones o necróticas en el cultivo (URUGUAY. MGAP. SA, 2012).

A partir de esta información se puede decir que la fitotoxicidad observada en las hojas, luego de la aplicación se debió a la alta humedad presente en la superficie foliar por un secado y ventilación deficiente, ya que bajo las condiciones de laboratorio no existieron factores ambientales que las proporcionen.

5. CONCLUSIONES

- En este estudio se constató que las diferencias en sensibilidad a pirimetanil detectadas *in vitro* entre los diferentes aislamientos de *Botrytis cinerea* seleccionados para la realización de los ensayos, no influyó en la capacidad del fungicida de controlar la enfermedad *in vivo*.
- En condiciones favorables para la acción del fungicida, el control ejercido por pirimetanil sobre el desarrollo y avance de la enfermedad es similar, aunque se disminuya la dosis recomendada por el fabricante a la mitad.
- Se confirma la aparición de fitotoxicidad en hojas de tomate a causa de la aplicación de pirimetanil en condiciones de alta humedad relativa en el ambiente (80-100%) o sobre superficies vegetales humedecidas, por lo tanto no es recomendable realizar aplicaciones inmediatamente luego de lluvias o en presencia de rocío sobre las plantas.
- La aplicación de pirimetanil bajo condiciones adecuadas, permitiría un control o retardo en el desarrollo de micelio y/o esporulación de un 100% al menos en los primeros siete días luego de la infección tanto al aplicar la dosis recomendada en la etiqueta como la mitad de la misma, siendo una efectiva herramienta para detener la dispersión del patógeno hacía plantas aledañas y así mantener la enfermedad a bajo nivel.

6. RESUMEN

En Uruguay las enfermedades causadas por *Botrytis cinerea*, tienen una alta incidencia provocando cuantiosas pérdidas en cultivos importantes en la producción del país. Tradicionalmente, la práctica más usada para el control de enfermedades fúngicas, entre ellas las causadas por este hongo, ha sido la utilización de fungicidas químicos. Sin embargo, la gran adaptabilidad de las cepas del hongo a los botricidas comerciales ha conllevado a la aparición de cepas resistentes. En el proyecto “Resistencia a fungicidas y variabilidad genética de *Botrytis cinerea* en el Uruguay” llevado a cabo en las Facultades de Agronomía y de Química de la Universidad de la República, se obtuvieron aislados monospóricos provenientes de varios cultivos de distintas zonas del país, determinándose que existen diferentes niveles de sensibilidad *in vitro* a los fungicidas más utilizados para controlar la enfermedad en Uruguay. Sin embargo, se desconocía el efecto de la resistencia observada *in vitro*, sobre las posibilidades de control del moho gris en condiciones de campo. La finalidad de este trabajo fue determinar el control ejercido por el fungicida pirimetanil (Venthos S.C), perteneciente al grupo químico de las anilopirimidinas, sobre el desarrollo de la enfermedad en hojas de tomate en función del nivel de sensibilidad detectado *in vitro*. Los ensayos fueron realizados en el laboratorio de la Unidad de Protección Vegetal de la Facultad de Agronomía. Folfolos de tomate, pulverizados previamente con el fungicida a dosis de etiqueta, a la mitad de ésta o con agua destilada, se inocularon con las suspensiones de esporas provenientes de cada aislamiento sobre una herida producida sobre el foliolo. Las hojas se colocaron en placas de petri y se incubaron en cámara húmeda a 24°C durante 7 días, evaluándose el crecimiento de la lesión diariamente. No se detectaron diferencias significativas entre el desarrollo de las enfermedades provenientes de aislamientos con diferente concentración mínima inhibitoria a pirimetanil. Es decir, que las diferencias en sensibilidad al fungicida detectadas anteriormente *in vitro*, no fueron confirmadas en los ensayos *in vivo*. Tampoco se apreciaron diferencias a nivel estadístico en el control ejercido por el fungicida sobre la enfermedad al utilizar la dosis recomendada en la etiqueta del producto y la mitad de la misma. El control del desarrollo de micelio y esporulación fue de 100% en todos los aislamientos tratados con fungicida.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*; Anilopirimidinas; Pirimetanil; Resistencia.

7. SUMMARY

In Uruguay diseases caused by *Botrytis cinerea*, have a high incidence causing significant losses in crop production in the country. Traditionally, the most widely used practice to control fungal diseases, including those caused by this fungus has been the use of chemical fungicides. However, the great adaptability of fungus strains to commercial botryticides has led to the emergence of resistant strains. In the project "Resistance to fungicides and genetic variability of *Botrytis cinerea* in Uruguay" carried out in the Colleges of Agriculture and Chemistry at the University of the Republic, monosporic isolates were obtained from various crops in different parts of the country and different levels of *in vitro* sensitivity to fungicides commonly used to control the disease in Uruguay were determined. However, the effect of resistance observed *in vitro* on the possibilities of control of gray mold in field conditions is unknown. The purpose of this work is to determine the control obtained with the fungicide Pyrimetanil (Venthos SC), belonging to the chemical group anilopyrimidines on the development of the disease in tomato leaves according to the sensitivity level detected *in vitro*. The tests were conducted in the laboratory of the Plant Protection Unit of the Faculty of Agronomy. Tomato leaflets, previously sprayed with the fungicide at the recommended dose half this dose or distilled water were inoculated with spore suspensions from each isolate on a wound caused on the leaflet. The leaves were placed in petri dishes and incubated in a moist chamber at 24 ° C for 7 days, the diameter of the lesion was evaluated daily. In this study no significant differences were detected between isolates with different minimum inhibitory concentration to pyrimethanil in development. The differences in sensitivity to fungicide previously detected *in vitro*, were not confirmed *in vivo*. Nor were there significant differences in the control by the fungicide between using the dose on the label, and half this dose. The fungicide completely controlled the development of mycelium and sporulation.

Keywords: *Botrytis cinerea*; Anilopyrimidines; Pyrimethanil; Resistance.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGRIOS, G. N. 2008. Fitopatología. 2ª ed. México, UTEHA. 838 p.
2. ALEXOPOULOS, C.J. 1966. Introducción a la micología. Buenos Aires, EUDEBA. 615 p.
3. ANFOSSI, L.; SALES, P.; VANNI, A. 2006. Degradation of anilinopyrimidine fungicides photoinduced by iron (III)-polycarboxylate complexes. Pest Management Science. 62(9):872-879.
4. BENITO, E.; ARRANZ, M.; ESLAVA, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista Iberoamericana de Micología. 17: 43-46.
5. BRENT, K.; HOLLOMON, D. 2007a. Fungicide resistance in crop pathogens; how can it be managed?. (en línea). 2nd. rev. ed. Bristol, UK, Newline Graphics. p. 50. Consultado set. 2012. Disponible en http://www.frac.info/frac/publication/anhang/monograph1_frac1.pdf
6. _____. 2007b. Fungicide resistance; the assessment of risk. (en línea). 2nd. rev. ed. Bristol, UK, Aimprint. pp. 28-30. Consultado set. 2012. Disponible en http://frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_Mono2_2007.pdf
7. CAÑEDO, V.; AMES, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Centro Internacional de la Papa. 62 p.
8. CASSANELLO, M. E. 2000. Algunas enfermedades del tomate. Montevideo, Facultad de Agronomía. 11 p.
9. COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE (CMI). 1974. Description of pathogenic fungi and bacteria. Surrey, Eastern. 1 p. (Ficha no. 431).
10. ELAD, Y.; WILIAMSON, P.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. 2004. *Botrytis*; biology, pathology and control. Dordrecht, Springer. 403 p.
11. ESPINOSA DE LOS MONTEROS, M.C. 2006. Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis Doctoral. Puerto Real, Cádiz, España. Universidad de Cádiz. 206 p.

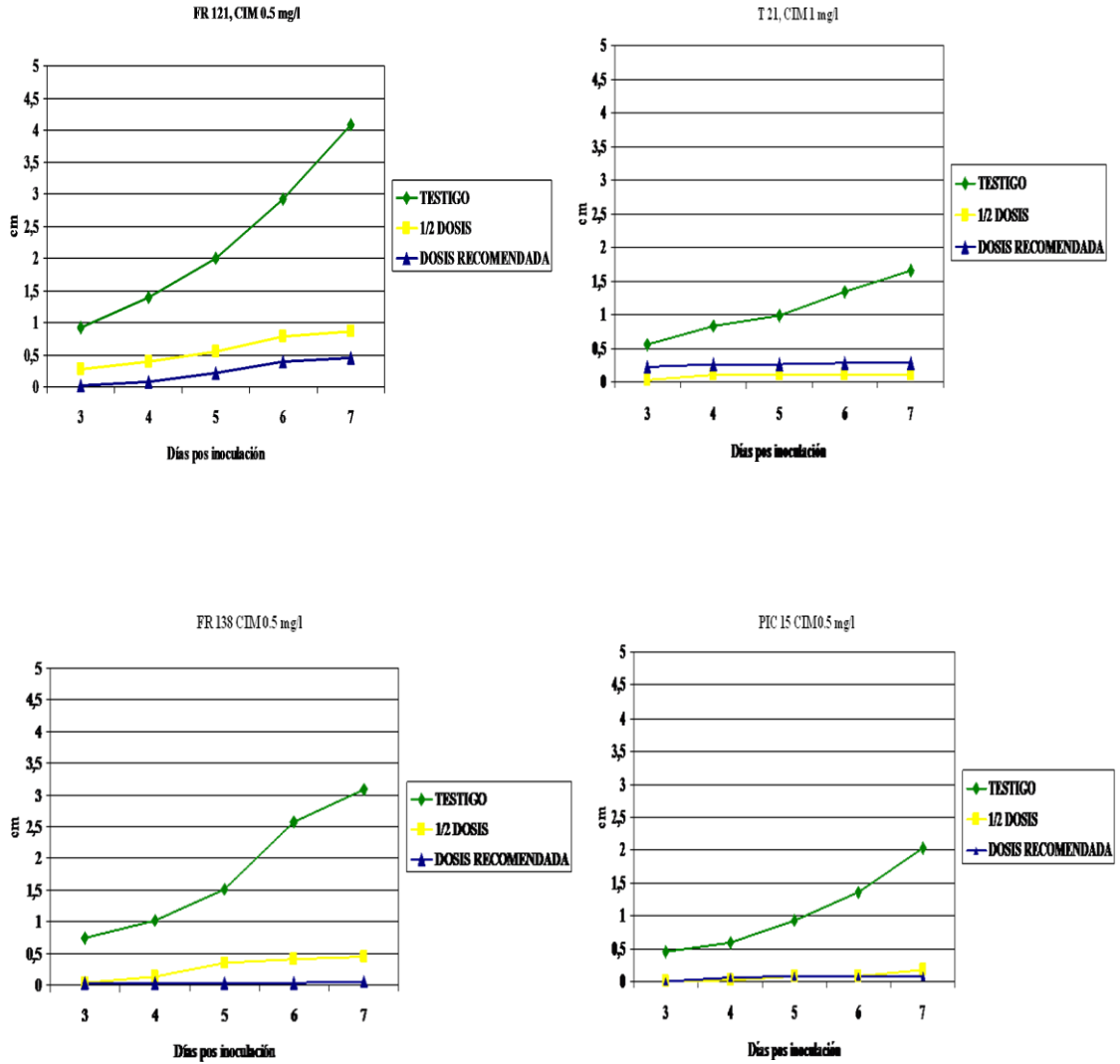
12. FORSTER, B.; STAUB, T. 1996. Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. Crop Protection. 15(6):529 - 537.
13. FRENCH, E.R.; HEBERT, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica, IICA. 289 p. (Libros y materiales educativos, no. 43).
14. FRITZ, R.; LANEN, C.; CHAPELAND-LECLERC, F; LEROUX, P. 2003. Effect of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil on the cystathionine β -lyase of *Botrytis cinerea*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 77(2): 54-65.
15. FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). 2005. Pathogen risk list. (en línea). Limburgerhof. 5 p. Consultado 15 oct. 2012. Disponible en http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_Pathogen_risk%20list.pdf
16. _____. 2012a. Anilinopyrimidines (AP's) working group. (en línea). Frankfurt. 4 p. Consultado dic. 2012. Disponible en http://www.frac.info/work/FRAC%20AP_Dec%202012%20final%20meeting%20minutes.pdf
17. _____. 2012b. Code list 2012. Fungicides sorted by mode of action. (en línea). Limburgerhof. 10 p. Consultado 15 oct. 2012. Disponible en <http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC%20Code%20List%202011-final.pdf>
18. GEPP, V.; VERO, S.; CASSANELLO, M.E.; ROMERO, G.; SILVERA, E.; GONZALEZ, P.; REBELLATO, J.; FERREIRA, Y.; BENTANCUR, O. 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. Agrociencia (Montevideo). 16(1): 97-107.
19. GIMÉNEZ, G; PAULLIER, J; MAESO, D. 2003. Identificación y manejo de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de frutilla. Montevideo, INIA. pp. 15-16 (Boletín de Divulgación no. 82).
20. HEWITT, H.G. 1998. Fungicides in crop protection. Madison, WI, CAB International. 221 p.

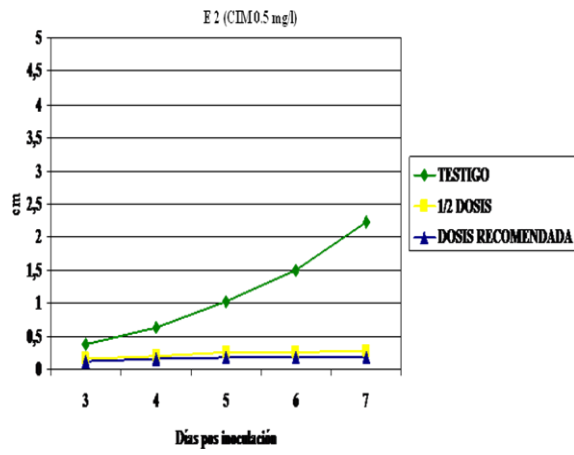
21. HOLZ, G.; COERTZE, S.; WILLIAMSON, B. 2004. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces; Growth on plant surfaces. In: Elad, Y.; Wiliamson, P.; Tudzynski, P.; Delen, N. eds. *Botrytis*; biology, pathology and control. Dordrecht, Springer. pp. 9-28
22. JALIL, C.G.; APABLAZA, G.; LATORRE, B.A. 1997. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la sensibilidad de *Botrytis cinérea* a pirimetanil. In: Congreso Nacional de Fitopatología (6º., 1997, Santiago de Chile). Resúmenes. Santiago de Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile. v.7, pp. 68-69.
23. LATORRE, G.B. 1986. Manejo de *Botrytis cinerea* en uva de mesa. Revista Frutícola. 7: 75-83.
24. LEROUX, P. 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides; fungicides whose activity is reversed by methionine. In: Elad, Y.; Wiliamson, P.; Tudzynski, P.; Delen, N. eds. *Botrytis*; biology, pathology and control. Dordrecht, Springer. pp. 195-222.
25. LISBOA MINGUZZI, M.A. 2006. Efectividad de *Bacillus subtilis* y una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de la pudrición gris en vid vinífera. Tesis de Grado. Talca, Chile. Universidad de Talca. 49 p.
26. MARTÍNEZ, E.; CARDENÁS-SORIANO, E.; ZABALETA, E. 2004. Infección de *Botrytis cinerea* pers.; fr. en dos cultivares de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd). Revista Mexicana de Fitopatología. 22(002):290-298.
27. MODERNEI, P. 2009. Guía para la protección y fertilización vegetal. 11ª ed. Montevideo, SATA. 499 p.
28. MOYANO, C.; GÓMEZ, V.; MELGAREJO, P. 2004. Resistance to Pirimetanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. Journal of Phytopathology. 152: 484 - 490.
29. PETSİKOS-PANAYOTAROU, N.; MARKELLOU, E.; KALAMARAKIS, A.E.; KYRIAKOPOULOU, D.; MALATHRAKIS, N.E. 2002. *In vitro* and *in vivo* activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* isolates resistant to other botryticides and selection for resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. Plant Pathology. 109: 173–182.

30. RIBERA FONSECA, A.E. 2007. Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* mol. cultivada in vitro en *Botrytis cinérea* pers. Tesis Doctoral. Temuco, Chile. Universidad de la Frontera. 114 p.
31. TOPOLOVEC-PINTARI, S.; CVJETKOVI, B. 2002. In vitro sensitivity of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. to pyrimethanil and cyprodinil in some Croatian vineyards. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 110(1):54–58.
32. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. SERVICIOS AGRÍCOLAS. 2009. Sistema de Consulta de registros y etiquetas de productos sanitarios. (en línea). Montevideo. Consultado oct. 2012. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/fitosanitarios/hconsprofitactivo.ashx>
33. VAN DEN BOSCH, F.; PAVELEY, N.; SHAW, M.; HOBBELEN, P.; OLIVER, R. 2011. The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? *Plant Pathology*. 60: 597–606.
34. VANNI, A.; FONTANA, F. 2003. Photodegradation of Pyrimethanil induced by iron(III) in aqueous solutions. (en línea). *Journal of Environmental Monitoring*. 5(4):635-639. Consultado set. 2012. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948240>
35. _____.; ANFOSSI, L.; CIGNETTI, A.; BAGLIERI, A.; GENNARI, M. 2006. Degradation of pyrimethanil in soil; influence of light, oxygen, and microbial activity. (en línea). *Journal of Environmental Science Health*. 41(1):67-80. Consultado set. 2012. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16393896>
36. VERO, S.; MONDINO, P. 2002. Control biológico de enfermedades de plantas. Montevideo, Facultad de Agronomía. 159 p.

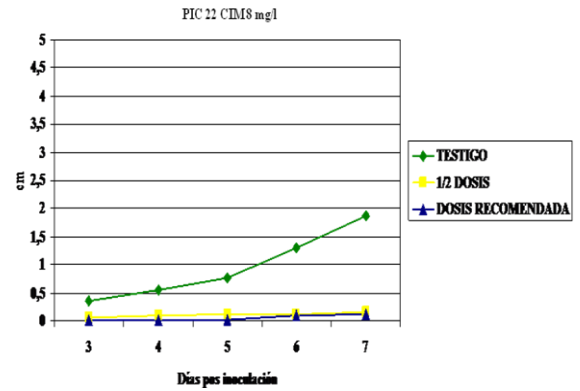
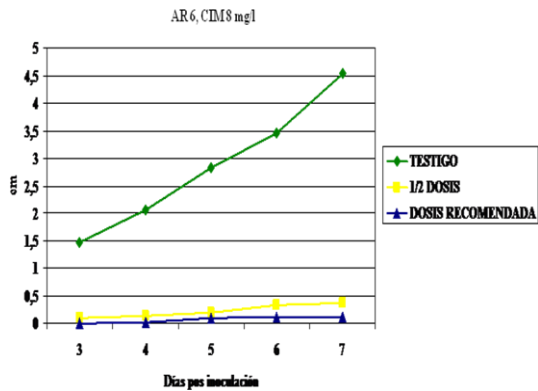
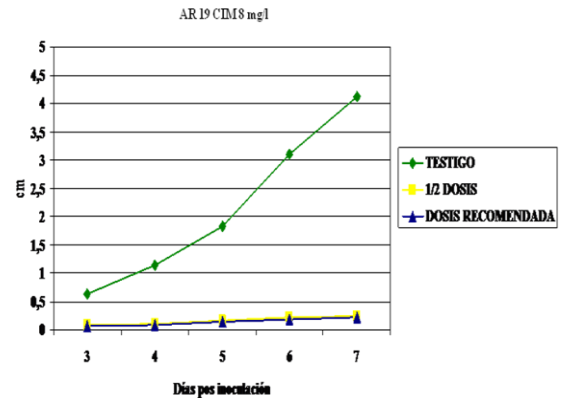
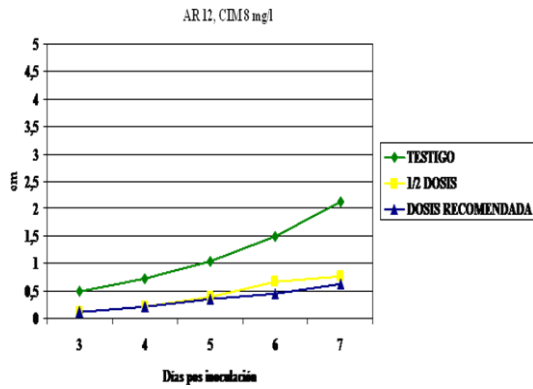
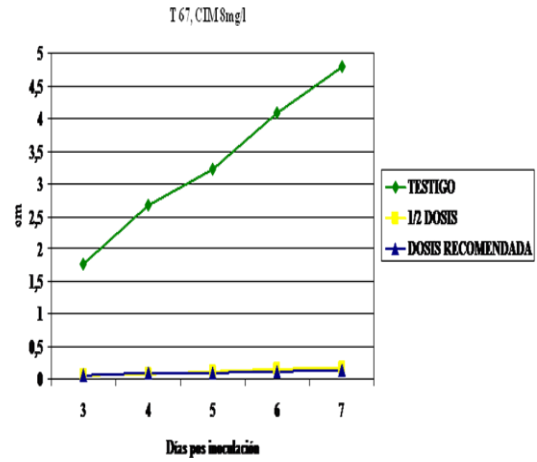
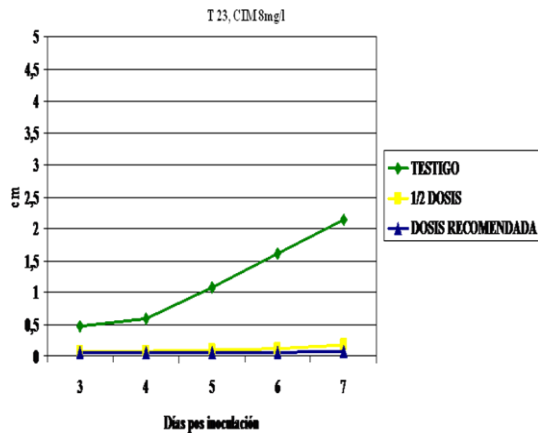
9. ANEXOS

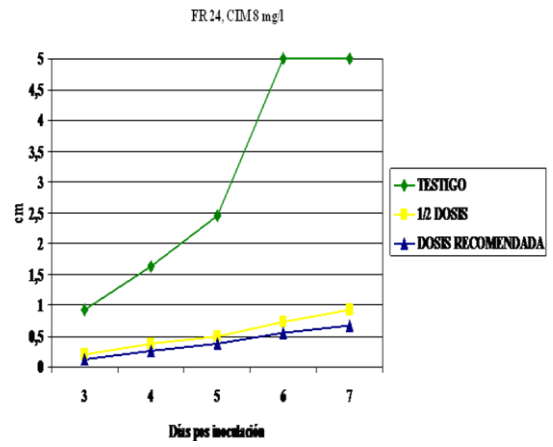
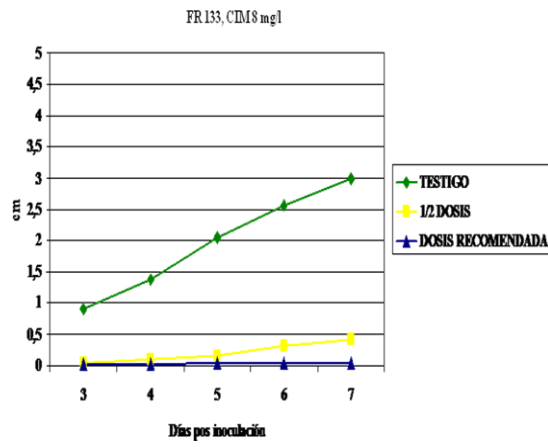
Anexo 1. Resultados del crecimiento de los diferentes aislamientos con CIM entre 0,5 - 1 ppm a pirimetanil.





Anexo 2. Resultados del crecimiento de los diferentes aislamientos con CIM ≥ 8 ppm





Anexo 3: Diagrama que relaciona el riesgo de generación de resistencia ejercido entre el fungicida y el riesgo inherente por parte del patógeno (* sólo las clases más importantes y de los grupos mencionados) según Brent y Hollomon (2007b).

Fungicide Classes*	Fungicide Risk	Combined Risk		
		3	6	9
benzimidazoles dicarboximides phenylamides QoI fungicides	high = 3	3	6	9
carboxamides SBI fungicides anilinopyrimidines phenylpyrroles phosphorothiolates	medium = 2	2	4	6
multi site fungicides (e.g.dithiocarbamates Copper, Sulphur) MBI-R inhibitors SAR inducers	low = 1	1	2	3
Pathogen risk	low = 1	medium = 2	high = 3	
Pathogen groups *	seed borne pathogens (e.g. <i>Pyrenophora</i> spp. <i>Ustilago</i> spp.) soil-borne pathogens (e.g. <i>Phytophthora</i> spp.) rust fungi <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>Tapesia</i> spp.	<i>Rhynchosporium secalis</i> <i>Septoria tritici</i>	<i>Erysiphe graminis</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Penicillium</i> spp. <i>Magnaporthe grisea</i> <i>Venturia inaequalis</i> <i>Mycosphaerella fijiensis</i> <i>Phytophthora infestans</i>	

Anexo 4. Crecimiento de la lesión en folíolos con tratamiento testigo: (A) cuarto día, (B) quinto día y (C) sexto día post-inoculación respectivamente.



A

B

C