



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

TESINA DE GRADO EN LA LICENCIATURA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PROFUNDIZACIÓN MICROBIOLOGÍA

**Evaluación “in vitro” de la sensibilidad a diferentes fungicidas  
de cepas de *Botrytis cinerea* obtenidas de uvas Tannat.**

**Ivanna Marini Enrique**

***Orientador: Mag. Raquel Alonso***

*Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias Udelar*

*Febrero, 2019*

*Montevideo, Uruguay*

## Índice

Agradecimientos .....	3
Resumen .....	4
Introducción .....	5
El patógeno <i>B.cinerea</i> .....	8
Podredumbre de racimo en la vid.....	10
Importancia de la vitivinicultura en Uruguay.....	14
Tipos de control .....	16
Prácticas culturales .....	16
Control Químico .....	16
Fungicidas usados en el control de <i>B.cinerea</i> .....	18
Boscalid + Pyraclostrobin (BELLIS®).....	19
Ciprodinil + Fludioxonil (SWITCH ® Syngenta).....	20
Fenexamida (TELDOR ®, Bayer CropScience) .....	21
Tebuconazol + Fluopiram (Luna® BAYER®, CropScience) .....	22
Extracto de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Timorex Gold® Lanafil) .....	22
Objetivos.....	23
Objetivo general .....	23
Objetivos específicos .....	23
Materiales y Métodos.....	24
Análisis estadísticos .....	29
Resultados.....	30
Discusión.....	39
Conclusiones .....	44
Bibliografía.....	45
Anexo .....	50

## Agradecimientos

Agradezco a mi familia por apoyarme todos estos años transcurridos, a mi madre, a mi padre, a la Tía Jurita y a la Madrina Adriana por estar continuamente motivándome y alentándome para poder culminar con este ciclo. A mis hermanas Giuliana y Mikaela por su cariño y por soportarme en mis momentos de locura y estrés.

Agradezco a todos mis amigos, los que año a año fui descubriendo y generando una buena amistad, a los amigos de la vida que nada tiene que ver con la ciencia, que nunca entendieron que estudio, porque lo estudio y para qué, pero nunca faltaba oportunidad para alentarme y motivarme, especialmente Carolina, Maria Ines y Valentina. Agradezco especialmente haber conocido personas como Gabriela Burgueño Rodriguez, Agustina Acosta y Lara, Lucia Bidondo, Antonella Arrieta y Felipe Montenegro y Mariana Trillo, con los cuales genere una gran amistad que fue y es de gran aprendizaje.

Agradezco a mi tutora, Msc Raquel Alonso por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su conocimiento científico, así como también haberme tenido la paciencia de guiarme durante todo el desarrollo de mi tesis.

Para finalizar también agradezco a todas las chicas del laboratorio de Micología de Facultad de Ciencias quienes hicieron siempre agradable mi transcurso en la institución, especialmente a Belén y Susana quienes siempre tuvieron palabra de motivación y disposición para ayudarme en todo momento.

## Resumen

La vitivinicultura en Uruguay representa un sector importante en la producción agrícola y cuenta con casi 6343 hectáreas de viñedos de óptima calidad enológica, con una producción media anual de 67 millones de litros de vino ([www.inavi.com.uy](http://www.inavi.com.uy)). Uno de los principales problemas sanitarios que afecta a los viñedos es la podredumbre de racimo provocado por el hongo *Botrytis cinerea*. La infección de las bayas producida por este hongo, modifica la composición química de la uva, generando un aumento de la sensibilidad a la oxidación, la contaminación por bacterias y afecta el aroma y sabor de los vinos. Esto lleva a grandes pérdidas económicas para los productores, no solo cuantitativas y de rendimiento sino también de calidad y estabilidad de los vinos. El control de éste patógeno es fundamental a la hora de mejorar la calidad del producto final y la competitividad del sector vitivinícola. El manejo de la podredumbre de racimos está basado en una combinación de medidas culturales y de sucesivas aplicaciones de fungicidas, haciendo este control eficiente, pero al mismo tiempo corriendo riesgos de ocasionar resistencia frente a los productos utilizados.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad “*in vitro*” de diferentes aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de uvas Tannat, frente a distintos fungicidas de uso frecuente. Se evaluó el efecto de 14 aislamientos de *B. cinerea* bajo condiciones de laboratorio frente a los diferentes fungicidas. Se determinó que todas las cepas fueron sensibles a los fungicidas evaluados excepto el producto orgánico en base a extracto de *Melaleuca alternifolia*. Se observaron diferencias significativas en la respuesta de los diferentes aislamientos para un mismo producto y además para cada aislamiento se observaron diferencias frente a los productos fungicidas evaluados. Se determinó que *B. cinerea* presenta una respuesta diferencial de sensibilidad a algunos

botryticidas. Los productos Syngenta (experimental), fenexamida y ciprodinil + fludioxonil fueron eficientes para los 14 aislamientos mientras que los productos mezclas boscalid + pyraclostrobin y tebuconazol + fluopiram fueron eficientes para 9. Los productos evaluados presentaron efecto fungicida a las concentraciones recomendadas. El fungicida ciprodinil + fludioxonil y el experimental de Syngenta fueron los únicos que no permitieron el desarrollo de tubo germinativo durante la exposición al producto bajo la concentración recomendada. Se determinó que la concentración efectiva para inhibir el 90% del crecimiento del micelio de ciprodinil+fludioxonil (EC<sub>90</sub>) fue de 16,03µg/ml.

## Introducción

*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, (anamorfo *Botrytis cinerea* Pers.: Fr) es un hongo Ascomycete, perteneciente al orden Moniliales de la familia Sclerotiniaceae (Williamson et al., 2007) que se encuentra presente en diferentes hábitats bajo forma de micelio, conidios, clamidosporas y esclerocios (Elad, 2007; Williamson et al., 2007). Las colonias de *B. cinerea* producen gran cantidad de micelio formado por hifas septadas. Cuando el hongo comienza el crecimiento presenta un color blanco hialino que se torna grisáceo debido al proceso de esporulación que genera gran cantidad de esporas (Barnett & Hunter, 1998) (Figura 1). Durante el periodo de reproducción asexual, *B. cinerea* genera hifas especializadas que sobresalen de los filamentos de micelio llamados conidióforos. Los mismos son rectos y lisos, de 2mm de longitud, alternativamente ramificados y con ápices esféricos gruesos donde se encuentran células conidiógenas las cuales presentan pequeños denticulos en donde se originan los conidios (Barnett & Hunter, 1998). La célula conidiógena forma

conidios ovoides hialinos a castaño claro, lisos y unicelulares de 10 -12  $\mu\text{m}$  de longitud por 8-10  $\mu\text{m}$  de ancho. El tipo de conidiogénesis que presenta es holoblastica sincrónica, generando una estructura en racimo y una cantidad importante de esporas (Elad, 2007), éstos son diseminados por el viento (Weber & Hahn, 2011). Los conidios de *Botrytis* spp. son generalmente considerados como los propágulos de corta vida en el campo y su supervivencia depende en gran medida de las temperaturas, la disponibilidad de humedad, actividad microbiana y la exposición a la luz solar (Elad, 2007). En ocasiones forma esclerocios, considerados muy importantes para la sobrevivencia del hongo ya que estas estructuras le permiten resistir condiciones climáticas desfavorables (Kumari et al., 2014) (Figura 1c). De Bary (1886) describió el esclerocio como una estructura de tipo tubérculo constituido de filamentos entrelazados que se forman sobre un micelio primario, que posteriormente se desprende en la madurez y pasa a través de un período de latencia antes de utilizar las reservas acumuladas durante el desarrollo para la producción de conidiforos. Se puede distinguir distintas zonas, una corteza periférica de hifas estrechamente juntas y pigmentadas, donde se acumulan reservas y debido al engrosamiento en las paredes celulares se reduce la permeabilidad de las hifas más descompactadas. Son variados los factores implicados en la iniciación de la formación de los esclerocios, siendo la luz, pH, la interacción con otros organismos y la temperatura alguno de ellos (Willetts & Bullock, 1992).

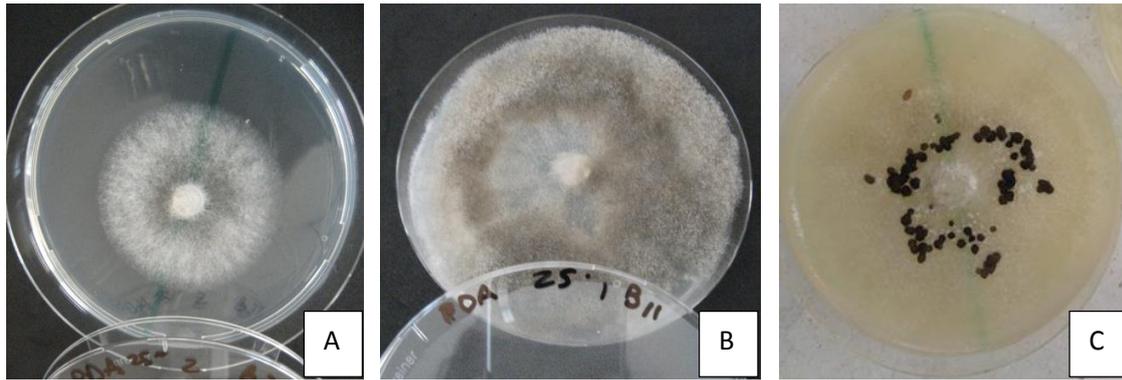


Figura 1.A: micelio *B. cinerea* en medio papa dextrosa agar (PDA) a 25 °C con 2 días de crecimiento. B: micelio de *B.cinerea* esporulado en medio PDA a 25°C con 10 días de crecimiento. C: esclerocio de *B. cinerea* en medio agar extracto de malta (MEA) a 15°C.

*B.cinerea* posee una variedad de elementos genéticos extracromosómicos incluyendo los cromosomas de las mitocondrias, plásmidos y elementos transponibles (Rosewich & Kistler, 2000). Los elementos móviles llamados transposones son secuencias genómicas repetitivas y abundantes en organismos eucariotas que tiene la capacidad de moverse de una localización a otra del cromosoma. Generalmente cuando esto ocurre se replican a sí mismos. La capacidad de replicación de elementos de transposición es la esencia del éxito evolutivo y es una de las razones de las variaciones en la dinámica poblacional en *B.cinerea* (Bowen & Jordan, 2002). A partir de estudios de las distribuciones alélicas y el uso de las herramientas moleculares se ha demostrado que *B. cinerea* es un complejo de dos especies crípticas, que viven en simpatria (Walker et al., 2011). *B.cinerea* ha sido subdividida en dos grupos genéticamente aislados, denominados Grupo I y Grupo II, en función de la presencia o ausencia dos elementos transponibles: *boty* y *flipper* (Giraud et al., 1997) por lo que se propuso que sean especies filogenéticas diferentes (Choquer et al., 2007; Fekete et al., 2012). Las cepas del Grupo I, corresponde a las especie *Botrytis pseudocinerea* carecen de elementos *boty* y *flipper* , mientras que las del Grupo II,

corresponden a la especie más extendida *B. cinerea sensu stricto* que puede presentar dos genotipos: *transposa* (Flipper+/Boty+), que posee ambos transposones, *boty* (Flipper-/Boty+) y *flipper* (Flipper+/Boty-)(Giraud et al., 1999; Munoz et al., 2002) y genotipo vacuua (Flipper-/Boty-), que carece de estos (Giraud et al., 1997).

## El patógeno *B.cinerea*

El género *Botrytis* es cosmopolita e incluye más de 22 especies (Staats et al., 2005). Dentro de este, se destaca la especie *Botrytis cinerea* Pers: Fr, un hongo fitopatógeno necrotrófico (Fekete et al., 2012), que es capaz de sobrevivir en el suelo y crecer en material vegetal del suelo (Steel et al., 2013). Es considerada la especie más patógena y destructiva de este género (Vercesi et al., 2014) ya que induce la muerte de la célula hospedadora y daña gravemente los tejidos de la planta, culminando en la podredumbre de la planta o los frutos (Van Kan, 2005).

*B. cinerea* no es hospedero específico (Derckel et al., 1999) debido a que causa serias enfermedades pre y post cosecha en al menos 200 especies de plantas (Campia et al., 2017; Williamson et al., 2007) y su virulencia varía dependiendo de la planta infectada (Derckel et al., 1999). Se considera el principal agente causal de la enfermedad comúnmente llamada “del moho gris” (Fekete et al., 2012; Steel et al., 2013), donde la gran acumulación de conidióforos hace que el órgano afectado se observe de tono grisáceo (Figura 2).

Este patógeno está relacionado con numerosos cultivos agronómicamente importantes (Viret et al., 2004) que incluyen hortalizas como ser tomate, lechuga,

calabaza, pimiento, zanahoria, pepino, berenjena, plantas ornamentales como ser rosa, clavel, tulipán, entre otros y frutales tales como frutilla, arándano, manzana, naranja, pera y su hospedador económicamente más importante, la vid (*Vitis vinífera*) (Gepp et al., 2012; Van Kan, 2005). *B.cinerea* es considerado un hongo pectinolítico (Carpita & Gibeaut, 1993) por lo que sus hospederos son principalmente dicotiledóneas (Fekete et al., 2012) y monocotiledóneas no gramíneas debido a que tienen un alto contenido de pectina en las paredes celulares (Carpita & Gibeaut, 1993).

A nivel mundial *B.cinerea* ha sido catalogado como el segundo patógeno fúngico más importante basados en la importancia económica (Dean et al., 2012).



Figura 2. Enfermedad del “moho gris” o podredumbre de racimo causada por *B.cinerea*.

## Podredumbre de racimo en la vid

Los principales responsables de las podredumbres de racimos de uvas son bacterias (podredumbre acida) y hongos filamentosos, de ellos, el más común es *B.cinerea* que genera la llamada “podredumbre gris de racimo”, pudiéndose encontrar también *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. (Steel et al., 2013) y *Colletotrichum gloeosporioides* (Steel, Savocchia, & Greer, 2016).

*B.cinerea* está presente en los viñedos como micelio y clamidosporas, en forma de esclerocios en el suelo (Williamson et al., 2007), o en forma de conidios por lo que las fuentes de inóculos en el cultivo son múltiples. Puede infectar heridas o tejido senescente y también inducen necrosis invadiendo tejidos jóvenes (Keller et al., 2003). Puede afectar todas las partes aéreas de la planta, las hojas, zarcillos, brotes jóvenes y sarmientos, las inflorescencias y las bayas maduras (Elad, 2007; Fekete et al., 2012; Rosslenbroich & Stuebler, 2000). No obstante es en los racimos donde la podredumbre adquiere gran significancia dada la capacidad del hongo de producir enzimas pectinolíticas y toxinas (Doss, 1999) alterando la calidad de las bayas.

El ciclo de vida de este hongo en la vid implica una hibernación o estado esclerótico durante el invierno (Steel et al., 2013), solo siendo visibles en los sarmientos, también como micelio en las grietas de la madera y, en menor cantidad en las yemas. En primavera, bajo condiciones favorables de temperatura ( 20°C), humedad (>95%), el inóculo primario se produce a partir de la esporulación del micelio o de esclerocios que han pasado el invierno en el material necrótico de la viña (Figura 3)(Steel et al., 2013).

El proceso infeccioso comienza cuando los conidios, por acción del viento u organismos vectores que se depositan sobre la superficie del tejido del hospedero

(Van Kan, 2005), se adhieren mediante la producción de una matriz extracelular que contiene enzimas, proteínas y carbohidratos (Doss, 1999; Doss et al., 1995). Bajo condiciones de humedad favorables, los conidios germinan produciendo un tubo germinativo, el cual se convierte en un apresorio para luego penetrar los tejidos del huésped (Van Kan, 2005). Las células subyacentes mueren y el hongo establece una lesión primaria, en la que puede producirse necrosis (Van Kan, 2005).

La penetración puede ocurrir directamente, perforando la superficies intactas del huésped de forma mecánica y/o enzimática (Van Kan, 2005) o a través de heridas en la planta provocando así la infección sintomática. La penetración de los conidios por medio de aberturas naturales como ser estomas y lenticelas, o de estructuras especializadas de la planta, como glándulas secretoras y órganos florales (pistilo, estambres, unión entre sépalos) suelen ser el origen de las infecciones latentes, donde el patógeno está presente dentro de la baya sin causar síntomas de la enfermedad, generalmente hasta que la uva comienza a madurar (Keller, Viret, & Cole, 2003) dando lugar a fuentes de inóculo secundario.

Keller, Viret, & Cole 2003 demostraron que el periodo de floración es un momento crítico para la infección por *B. cinerea* en las uvas y sugieren que el sitio de infección más probable es el área del receptáculo aunque una pequeña parte de las infecciones también podría ocurrir a través del estigma y el estilo (Viret et al., 2004).

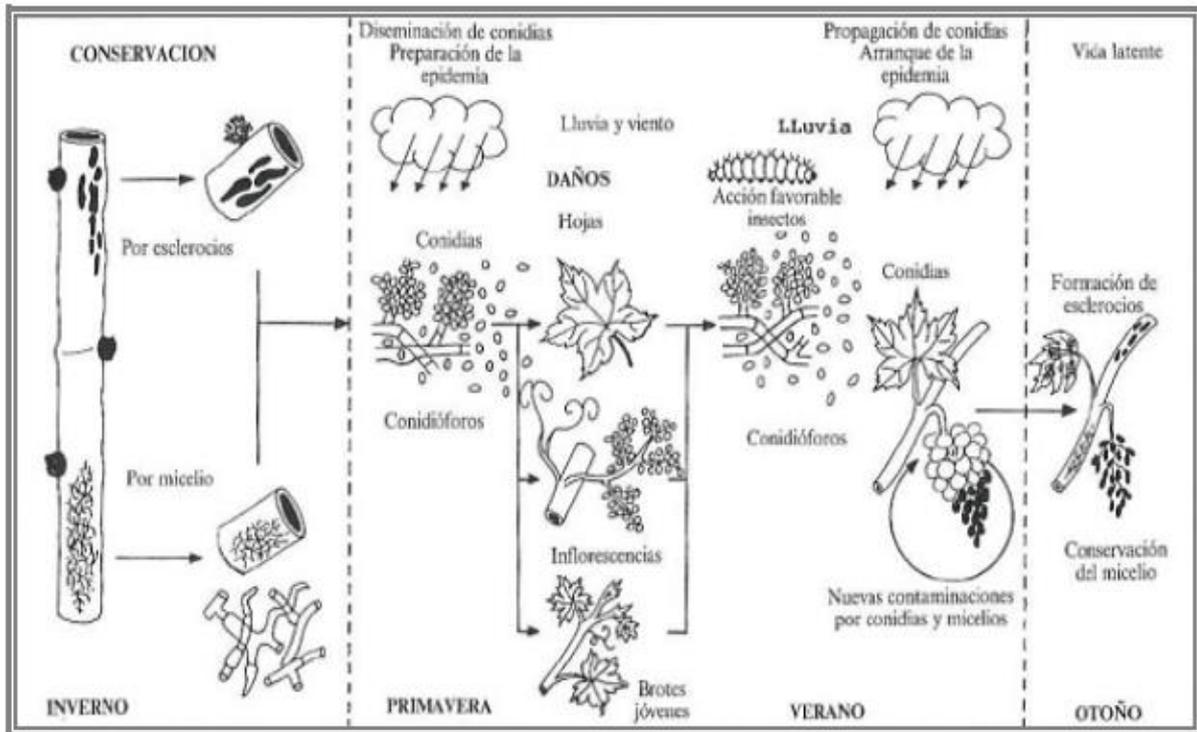


Figura 3. Ciclo biológico de *B. cinerea* sobre Vid (tomado de Hidalgo 1999)

Los factores que parecen ser determinantes para esta enfermedad en campo, son la susceptibilidad del huésped, la virulencia de la cepa de *B. cinerea* y las condiciones ambientales.

Los factores climáticos tienen una influencia muy importante en el desarrollo del hongo, siendo la temperatura, la humedad relativa y las precipitaciones los principales factores de riesgo para el desarrollo de *Botrytis* (Steel, Blackman, & Schmidtke 2013). Cuando las condiciones de humedad relativa en el viñedo superan el 93% (esencial para que los conidios germinen y penetren en la epidermis del hospedero) y las temperaturas son aproximadamente de 20°C (similares al óptimo de crecimiento in vitro), la capacidad de infección de *B. cinerea* en flores y bayas se ve favorecida (Latorre et al., 2002, Van Kan, 2000; Williamson et al., 1995). Ferrer et al 2001, sugieren que las lluvias previas a la cosecha, producen un efecto explosivo

sobre la aparición de las podredumbres del racimo. El riego excesivo, el viento y las lesiones por insectos (Keller et al., 2003) llevan a que las bayas se dañen fácilmente, lo que aumenta aún más las posibilidades de infección (Steel, Blackman, & Schmidtke 2013). Además, las lluvias de carácter tormentoso que suceden durante la época de maduración, son especialmente favorables para la propagación de los conidios (Viret et al., 2004) ya que el fenómeno de salpicado juega un papel fundamental a la hora de liberación y diseminación de los mismos.

La compactación del follaje, que depende de la variedad de la planta, es una variable importante a la hora de la infección por *B.cinerea*. Cuanto más compactado se encuentra el follaje mayor porcentaje de humedad retiene, creando así un microclima propicio para la enfermedad (Steel et al., 2013).

El efecto de la podredumbre por *Botrytis* en la uva afecta de forma negativa la calidad sensorial en la vinificación (Steel et al., 2013).

La podredumbre de racimos causa graves pérdidas de rendimiento, reducción de la calidad de los mostos y de calidad y estabilidad de los vinos, constituyendo uno de los principales factores de incidencia en las pérdidas económicas en la producción de vinos. El daño más importante es cualitativo debido a las modificaciones en la composición de las uvas infectadas. Las secreciones de enzimas oxidativas (ej. lacasa) oxidan compuestos fenólicos rápidamente en quinonas. La oxidación controlada conduce a la “maduración” del vino, pero cuando la oxidación es rápida o completa se compromete la calidad del producto visual y gustativo (Ribereau-Gayon, Dubourdieu, & Doneche, 2006; Dewey et al. 2008; Jackson & Lombard, 1993; Vercesi et al., 2014) y la estabilidad del vino.

## Importancia de la vitivinicultura en Uruguay

Dentro de América del Sur, Chile, Argentina y Brasil son los principales productores de vino y Uruguay se encuentra en el cuarto lugar. La historia de la vitivinicultura en Uruguay tiene más de 150 años y en los últimos años ha apostado a la producción de vinos de calidad y alta gama. La uva Tannat se ha consolidado como la principal variedad de nuestro país por su buena adaptación al suelo y al clima (INAVI, [www.inavi.com.uy](http://www.inavi.com.uy) 3/5/2018).

El vino uruguayo ha logrado abrir sus puertas para ingresar en el mundo de la competencia de la calidad internacional del vino, siendo consumido en más de 30 países, donde los más importantes son Brasil, Polonia, Canadá, México, EEUU, Francia y Reino Unido. La participación de los vinos uruguayos en los grandes concursos mundiales, en particular en bienales Internacionales desde hace más de 20 años, significó 144 medallas obtenidas por 31 bodegas Uruguayas (INAVI, [www.inavi.com.uy](http://www.inavi.com.uy) 3/5/2018).

Uruguay tiene un área vitivinícola reducida comparado con los países vecinos, por lo que es la vitivinicultura una importante rama en la producción agrícola uruguaya, donde se cuenta con casi 6343 hectáreas de viñedos (año 2018) de óptima calidad enológica con una producción media anual de 67 millones de litros de vino (año 2017). Los viñedos están fundamentalmente en manos de pequeños a medianos productores de uva y vino en su mayoría empresas familiares que han trabajado en el rubro por más de tres generaciones (INAVI, [www.inavi.com.uy](http://www.inavi.com.uy)).

Dadas las características climáticas del Uruguay es frecuente la ocurrencia de podredumbres de racimos de la uva. Según los registros que dispone el grupo de vitivinicultura de la Facultad de Agronomía desde 1996, se ha confirmado la

podredumbre de racimos en el 90% de las uvas en parcelas susceptibles, que en promedio sobre la totalidad del viñedo nacional, implicaría pérdidas de 9 millones de dólares (Ferrer et al., 2011; Ferrer & Gonzalez-neves, 2014). En los últimos años las cifras de producción de vino en nuestro país han sido irregulares, debido a la ocurrencia de eventos climáticos tales como granizos, exceso o falta de precipitaciones y el llamado “efecto año” que repercute en años posteriores, no solamente cuando suceden (Nair et al., 1995).

Los pronósticos climáticos prevén un aumento de la variabilidad temporal y aumento de la ocurrencia de eventos climáticos extremos (Jones et al., 2005), los cambios asociados al cambio climático en la calidad de la uva plantearán un desafío para las vinificaciones y la calidad final del vino en el futuro, en particular sobre la expresión de la uva, aromas, estabilidad microbiológica, química y equilibrio sensorial (Mira de Orduña, 2010).

Debido a las serias pérdidas económicas pre y post cosecha provocadas por *B. cinerea* (Ayoub et al., 2017) surge la necesidad de disponer de herramientas para contrarrestar con anticipación el riesgo potencial de desarrollo de esta enfermedad. Las estrategias y medidas de control para *B. cinerea*, se basan en la combinación de prácticas culturales y métodos químicos (Filingier & Walker, 2016; Gepp et al., 2012).

## Tipos de control

### Prácticas culturales

Las prácticas culturales utilizadas hoy en día son la destrucción de fuentes de inóculo antes y después de la cosecha. En la planta, se aplican medidas como el deshojado parcial para disminuir la densidad del follaje permitiendo la circulación de aire y disminuyendo la humedad durante el desarrollo de los racimos (Nair et al., 1995), desbrotados, reducción de cosecha mediante podas, descompactación y raleo manual de racimos (Molitor et al., 2011; Tardaguila et al., 2012).

### Control Químico

La mayoría de los métodos químicos, se basan en aplicaciones preventivas de fungicidas en determinados momentos del ciclo de la vida. Es la estrategia más utilizada para controlar la colonización de este hongo en los viñedos siendo el medio principal de protección eficiente y confiable contra *B.cinerea* (Filingier & Walker, 2016). A través de los años se han desarrollado fungicidas específicos llamados botrycidas (Ayoub et al., 2017).

Algunos fungicidas pueden ser fitotóxicos, generar problemas ambientales, de salud y desarrollar resistencia en patógenos (Sesan et al., 2015; Gepp et al., 2012). La resistencia, entendida como la capacidad adquirida de un microorganismo para crecer en presencia de un compuesto al que habitualmente era sensible, hace a este hongo considerablemente riesgoso a la hora de desarrollar resistencia a fungicidas debido a su corto ciclo de vida y su reproducción asexual, que permite rápidas mutaciones en el sitio de acción del fungicida dentro del patógeno (Pokorny et al., 2016). La mala

aplicación, el uso excesivo de fungicidas y la alta variabilidad genética de *B.cinerea*, ha llevado al surgimiento de cepas resistentes a benzimidazoles, dicarboximidas, anilino pirimidinas, hidroxianilidas (Veloukas et al., 2011) y se ha convertido en una amenaza para los productores (Kim et al., 2016).

La aplicación de fungicidas debe darse en momentos clave del desarrollo de la enfermedad, siendo indispensable la primer aplicación en la floración y la segunda entre envero y maduración (Campia et al., 2017), estados fenológicos que se caracterizan por presentar un mayor riesgo infección. Teniendo en cuenta la interacción de la planta con el fungicida, esto se clasifican a en fungicidas de contacto o fungicidas sistémicos. Los fungicidas de contacto son de acción múltiple, es decir, pueden afectar al mismo tiempo varias funciones celulares del patógeno. Estos fungicidas forman una barrera protectora sobre la superficie de la planta impidiendo la germinación de las esporas, ocasionando su muerte después de la germinación y antes que el tubo germinativo haya penetrado en los espacios intercelulares del hospedero. Al permanecer sobre la superficie de la planta, están sujetos a la degradación por la luz y a ser lavados por las lluvias. Son fungicidas de carácter preventivo que solo protegen la zona donde fue aplicado el producto ya que tienen poco movimiento sobre la superficie de la planta, por lo que son ineficaces en infecciones ya establecidas (Acuña, 2008).

Por otro lado, los fungicidas sistémicos son absorbidos por la planta a través de los estomas de las hojas o por las raíces y se translocan dentro de la planta. Estos evitan el desarrollo de enfermedades en los sitios de aplicación y aún en sitios donde no se aplicó el producto e inhiben varias etapas metabólicas del patógeno. A diferencia de los fungicidas de contacto, no están expuestos a la degradación por agentes ambientales y son más efectivos debido su capacidad de penetración y translocación.

La principal desventaja de estos productos es la rapidez con la que aparecen cepas resistentes (Acuña, 2008).

En la actualidad se cuenta con un amplio espectro de fungicidas y según la FRAC (en inglés: Fungicide Resistance Action Committee) los fungicidas se distinguen en grupos según su modo de acción bioquímico en las vías biosintéticas de los patógenos. En este sentido, se encuentran los fungicidas que inhiben el metabolismo energético a nivel de la respiración celular; los que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de lípidos o transporte, síntesis de la melanina en la pared celular, biosíntesis del esterol de membrana, biosíntesis de la pared; los que afectan estructura celular como la integridad de la membrana o su función, el citoesqueleto y las proteínas motoras; los inductores de defensa de la planta hospedera, los biológicos de acción múltiple y los químicos de actividad multisitio (FRAC, 2017).

### Fungicidas usados en el control de *B.cinerea*

Entre los grupos químicos comúnmente disponibles para el control de *B.cinerea* se encuentran los siguientes: hidroxianilidas (fenexamida), anilino pirimidinas (cyprodinil), piridin carboxamidas (boscalid), fenilpirroles (fludioxonil), triazoles (tebuconazole), benzamida (fluopiram), metoxi-carbomatos (pyraclostrobin) (FRAC, 2017;

Rosslensbroich & Stuebler, 2000). El uso de mezclas de ingredientes activos se introdujo con el propósito de evitar el desarrollo de resistencias específicas combinando ingredientes activos con distintos sitios de acción. Dentro de estos se encuentran cyprodinil + fludioxonil, boscalid + pyraclostrobin y terbuconazole + fluopiram.

#### Boscalid + Pyraclostrobin (BELLIS®)

El producto mezcla de boscalid y pyraclostrobin, pertenecen al grupo químico de las piridin carboxamidas y las metoxi-carbomatos respectivamente. Se trata de dos fungicidas químicamente diferentes con diferentes sitios de acción pero ambos actúan inhibiendo la respiración celular.

- Inhibidores de la respiración celular

Boscalid pertenece al grupo químico de las piridin carboxamidas, forma parte del grupo de los inhibidores del complejo succinato deshidrogenasa (SDHI), complejo II. Esta enzima juega un papel crucial en la obtención de ATP en el ciclo de Krebs y en el transporte de la cadena de electrones mitocondrial, por lo que su inhibición conduce a un bloqueo en la respiración celular (Filinger & Walker, 2016; FRAC, 2017). Tiene acción sistémica, y su modo de acción está asociado con la inhibición de la germinación de esporas, inhibición de la elongación del tubo germinativo, inhibición del crecimiento micelial y esporulación del hongo (Myresiotis et al., 2008)

El Piraclostrobin pertenece al grupo químico metoxi-carbomatos (FRAC, 2017) y es un metabolito producto del metabolismo secundario de hongos Basidiomycetes como *Strobilurus tenacellus* (Filinger & Walker, 2016). Este forma parte del grupo de los

inhibidores del complejo de citocromo III bc1 llamados Qols (en inglés: Quinone outside inhibitors) y el mecanismo de acción consiste en inhibir la cadena respiratoria por unión en el sitio Qo del citocromo b, causando el bloqueo del transporte de electrones (Myresiotis et al., 2008). ). En consecuencia, se afecta la inhibición de la germinación de esporas, el desarrollo del tubo germinativo y la esporulación.

Ciprodinil + Fludioxonil (SWITCH® Syngenta).

Este fungicida pertenecen al grupo químico de las anilino pirimidinas los cuales interfieren en la síntesis de proteínas como de aminoácidos y los fenilpirroles que actúan en la traducción de señales (FRAC, 2017).

- Inhibidores de la síntesis de amino ácidos

Dentro del modo de acción de las anilino pirimidinas, la inhibición de la biosíntesis de metionina (Filinger & Walker, 2016), y la secreción de enzimas hidrolíticas como cutinasas, lipasas, celulasas y proteasas (Rosslénbroich & Stuebler, 2000) hacen que ciprodinil no afectan la germinación de las esporas, pero inhiba la elongación del tubo germinal y el inicio del crecimiento micelial de *B. cinerea*, al menos in vivo (Rosslénbroich & Stuebler, 2000). El uso de este producto es recomendado como fungicida preventivo y presenta actividad protector.

- Inhibidores de la señales de transducción osmótica

Los fenilpirroles son análogos estructurales del compuesto antifúngico natural pirrolnitrina (Filinger & Walker, 2016), un antibiótico producido por especies de *Pseudomonas* (Rosslénbroich & Stuebler, 2000). Dentro de este grupo se encuentra el fludioxonil, inhibiendo la histidina quinasa en la traducción de señales osmóticas

(FRAC, 2017) e induciendo alteraciones morfológicas de los tubos germinales. Esto provoca una inhibición en la germinación de las esporas, en la elongación del tubo germinativo y en el crecimiento del micelio (Filinger & Walker, 2016).

Fenexamida (TELDOR ®, Bayer CropScience)

- Inhibidor en la biosíntesis del ergosterol

Dado que el ergosterol es un tipo de esteroles característico y específico de los hongos y es el mayor esteroles presente en las membranas de la mayoría de ellos, su biosíntesis constituye un blanco objetivo importante para los fungicidas generales (Filinger & Walker, 2016).

Fenexamida pertenece al grupo químico denominado hidroxianilidas, actúa inhibiendo la biosíntesis del ergosterol de membranas por inhibición de la 3-ceto reductasa de la posición C4 en la desmetilación conduciendo a la inhibición de la elongación del tubo germinativo, del crecimiento del micelio (Rosslénbroich & Stuebler, 2000) y a la acumulación de compuestos intermedios tóxicos (FRAC, 2017; Filinger & Walker, 2016). Es un fungicida de contacto, cuando se aplica a conidios de *B. cinerea*, fenexamida inhibe la germinación solo a concentraciones altas (Rosslénbroich & Stuebler, 2000). Poco después de la iniciación de germinación, los tubos germinativos se detienen, mostrando estructuras granulares en el citoplasma (Weber et al., 2011) y las esporas y los tubos germinales colapsan, muriendo antes de que sea capaz de penetrar la superficie de la planta (Bach et al., 2001; Rosslénbroich & Stuebler, 2000). Este fungicida es de fácil degradación presentando un favorable perfil toxicológico y comportamiento ambiental (Bach et al., 2001).

En el monitoreo de rutina, las cepas de *B. pseudocinerea* se pueden reconocer fácilmente, particularmente en la prueba de crecimiento micelial debido a su resistencia natural al fenexamida (Walker et al., 2011)

Tebuconazol + Fluopiram (Luna® BAYER®, CropScience)

- Inhibidor en la biosíntesis del ergosterol

Tebuconazol es un fungicida de acción translaminar y sistémica que pertenece al grupo químico de los triazoles. Su modo de acción es la inhibición de la ruta biosintética del ergosterol, afectando la biosíntesis de los esteroides de membrana (FRAC, 2017; Filinger & Walker, 2016).

- Inhibidores de la respiración celular

Fluopiram pertenece al grupo químico piridiniletibenzamidas y forma parte del grupo de los inhibidores del complejo succinato deshidrogenasa (SDHI) de la cadena respiratoria fúngica (FRAC, 2017).

Extracto de *Melaleuca alternifolia* (Timorex Gold® Lanafil)

Este fungicida también conocido como extracto del árbol de té, es de origen natural preventivo y curativo, perteneciente al grupo químico de los hidrocarburos y alcoholes de terpeno. Es un fungicida biológico que altera la barrera de permeabilidad de las estructuras de membrana de organismos vivos, se propuso que afecta la síntesis y el transporte de los lípidos de membrana distorsionando la integridad de la misma

provocando la inhibición del desarrollo de la germinación de las esporas, y la inhibición del crecimiento del micelio (FRAC, 2017).

El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, es también comúnmente utilizado con fines terapéuticos, con fines antiinflamatorios y antibacterianos (Hammer, Carson, & Riley, 2003).

Hipótesis:

Las poblaciones de *Botrytis* de los viñedos de uva Tannat son heterogéneas, existiendo diferencias en la sensibilidad a los diferentes fungicidas que se utilizan para su control.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la sensibilidad “*in vitro*” de cepas nativas de *Botrytis cinerea* obtenidas de uvas Tannat frente a diferentes productos fungicidas usados para su control.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de diferentes productos comerciales de uso común sobre la germinación de conidios de diferentes aislamientos de *B. cinerea*.
- Establecer si los productos utilizados presentan acción fungicida o fungistática.

- Determinar la concentración de inhibición del crecimiento micelial de un fungicida seleccionado, y comparar con las dosis habitualmente usadas en viñedos.

## Materiales y Métodos

1. Evaluación del efecto de productos fungicidas sobre la germinación de conidios de diferentes cepas de *B. cinerea*.

### 1.1 Evaluación por halo de inhibición

Se seleccionaron 14 aislamientos de *B.cinerea* obtenidos de uvas Tannat, provenientes de parcelas con distintos tratamientos con fungicidas, en un viñedo comercial localizado en la zona de Joanicó, Departamento de Canelones. Cada uno de los catorce aislamientos de *B. cinerea* fueron inoculados a partir de cultivos monospóricos a placas de Petri conteniendo agar papa dextrosa (PDA). Se incubaron en estufa a 24 +/- 1 °C durante 5 días. Una vez crecidos, se verificó la identidad de *Botrytis* por sus caracteres morfológicos bajo el microscopio realizando preparados montados con tinción de lactofenol-azul de algodón, utilizando la clave de Barnett y Hunter (1998) (Figura 4).

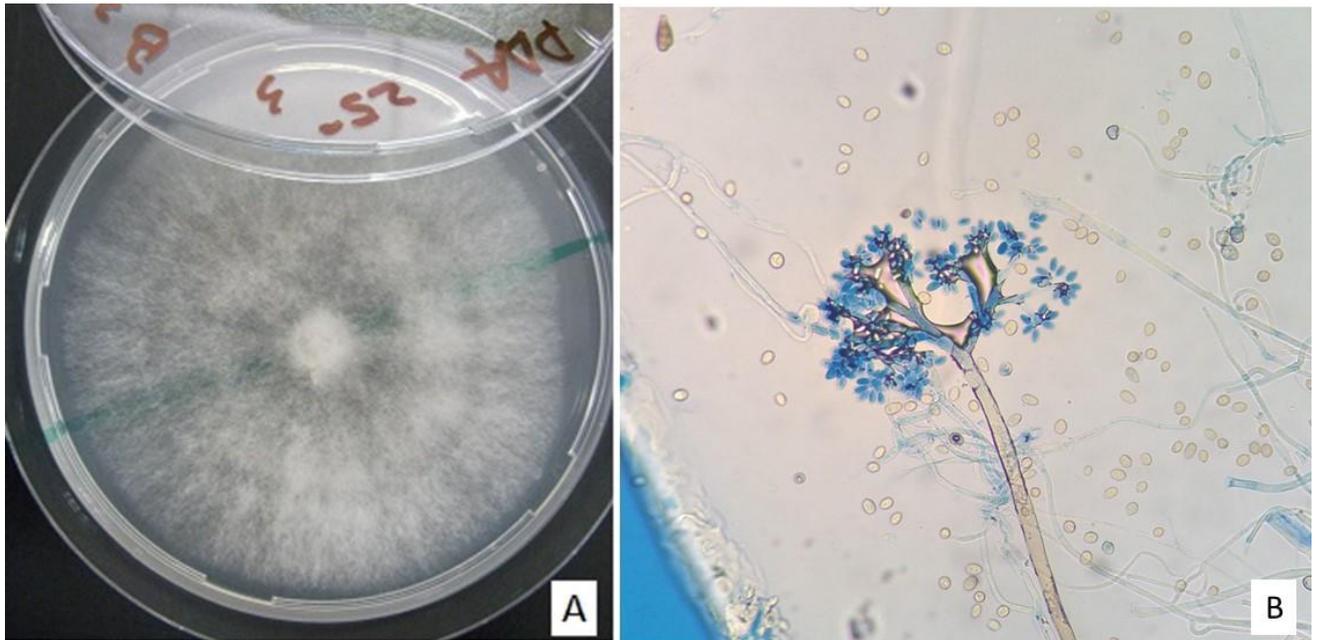


Figura 4. Características macroscópicas(A) y microscópicas 10x (B) de *B. cinerea* en medio, Fotos tomadas del autor.

Cuando el hongo estaba suficientemente esporulado se adicionaron 5ml de agua destilada estéril en cada una de las cajas de Petri y con ayuda de un asa de Drigalski estéril se removieron las esporas de la superficie, se realizó el recuento de las esporas en cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de  $10^6$  conidios /ml. Se sembraron 250  $\mu$ l de esta suspensión en la superficie de placas de Petri con medio PDA para así obtener un tapiz uniforme de esporas. Se colocaron de forma equidistante 3 discos de papel de filtro estériles de 0.5 cm de diámetro embebidos en 10  $\mu$ l de cada fungicida.

Los productos comerciales y sus compuestos activos que se evaluaron en este trabajo son los siguientes: Teldor de Bayer (50% fenexamida), Bellis de BASF (25,2% boscalid + 12,8% piroclostrobin), Switch de Syngenta (37,7% ciprodinil + 25% fludioxonil), Luna de Bayer (17,7% tebuconazol + 17,7 % fluopiram), Syngenta

(producto experimental), Timorex gold de Lanafil (extracto de *Melaleuca alternifolia*, producto orgánico).

Todos los productos fueron resuspendidos en agua esterilizada en un Erlenmeyer. Se utilizaron las dosis recomendadas por los productores para cada producto comercial siendo para fenexamida y boscalid+pyraclostrobin una concentración de 3300µg/ml, para ciprodinil + fludioxonil una concentración de 4400 µg/ml, para el producto Syngenta experimental, 4,4 µl/ml, tebuconazol + fluopiram, 3,3 µl/ml y el extracto de *Melaleuca alternifolia* una concentración de 4,4 µl/ml. Se incubó en la estufa a 24° +/- 1°C por 4 días. Al cuarto día se observaron las placas, se determinó la presencia de halo de inhibición y se midieron los halos tomando como punto de referencia el centro del disco y expresándose en cm. Se tomaron 2 medidas, se calculó media y desvío estándar. Se observó minuciosamente la zona de inhibición bajo el microscopio, para evaluar la presencia o ausencia de tubo germinativo en los conidios. Se utilizó el programa DinoCapture 2.0 y con un objetivo de x10 se observó y fotografió la presencia o ausencia de tubo germinativo para los distintos aislamientos de *B.cinerea* frente a los diferentes productos y se comparó con un control sin fungicidas.

## 1.2 Evaluación del efecto fungicida

Para evaluar el efecto fungicida se transfirieron con aguja estéril las esporas de la zona de inhibición a placas conteniendo medio PDA sin fungicida y se incubó en estufa a 24 +/- 1°C durante 3 días. Además se cortó un disco con sacabocados de vidrio estéril de 0,5 cm de diámetro en la zona de inhibición y se transfirió a placas

conteniendo medio PDA sin fungicida. Las mismas se incubaron en estufa y luego de 48 horas se observó si había desarrollo de micelio. En los caso que hubo crecimiento micelial se consideró que el producto presentó acción fungistática (provocando una inhibición temporal de la germinación y el crecimiento fúngico), mientras que en ausencia de crecimiento micelial, se consideró al producto con acción fungicida, debido a la pérdida de viabilidad de las esporas o del tubo germinativo una vez expuestos al producto.

2. Determinar la concentración de inhibición del crecimiento micelial de Switch® de Syngenta (ciprodinil + fludioxonil) y comparar con las dosis habitualmente usadas en viñedos.

Ciprodinil + fludioxonil es un fungicida de uso común para el control de Botrytis por lo cual es útil para la comparación de los resultados obtenidos. La selección de Switch® fue en base a los resultados obtenidos en los primeros ensayos, la presencia de inhibición total de la germinación de los conidios de todos los aislamientos, y su mantenimiento de inhibición en el tiempo.

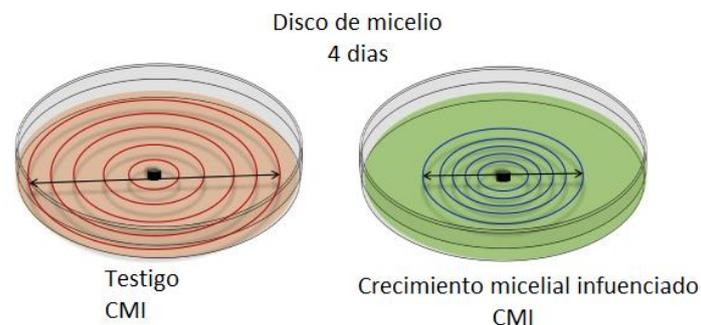
Se seleccionaron 3 aislamientos de *B.cinerea* en base a la sensibilidad de sus esporas frente a los productos evaluados, una que presento baja sensibilidad (B71), una de sensibilidad intermedia (B33) y una de sensibilidad alta (B49). Se evaluó el crecimiento del micelio en medio de cultivo con diferentes concentraciones del producto fungicida y se comparó con un control creciendo sin fungicida. Se calculó el porcentaje de inhibición micelial para cada una de los aislamientos.

Se preparó PDA incorporando el producto fungicida en las siguientes concentraciones: 4400µg/ml, 4,4 µg/ml 4,4x10<sup>-3</sup> µg/ml y 4,4x10<sup>-6</sup> µg/ml. Las diluciones fueron realizadas con agua destilada estéril, obteniéndose un volumen final de 100 ml de solución de producto. Se adicionó el fungicida en el medio de cultivo fundido y termostatzado a 45°C para evitar inactivar cualquier componente del principio activo del producto, se homogenizó y se repartió en placas de Petri de 9 cm de diámetro. En el centro de cada placa se colocó un disco de PDA de 5 mm de diámetro conteniendo micelio de los aislamientos de *B. cinerea* seleccionados, previamente crecidas durante 4 días 25 °C en medio PDA. Como testigo se empleó medio PDA sin fungicida. Todas las placas sembradas fueron incubadas a 25°C midiendo el diámetro de crecimiento en (cm). La evaluación concluyó cuando el micelio del patógeno cubrió totalmente la placa del testigo. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento.

La inhibición del crecimiento del micelio fue calculado como:

$$\% IM = \frac{CML - CMI}{CML} \times 100$$

(Ayoub et al., 2017).



%IM=Porcentaje de Inhibición de crecimiento micelial

CML=Crecimiento micelial libre, diámetro de crecimiento (cm) de *B. cinerea* en el testigo

CMI=Crecimiento micelial influenciado, diámetro de crecimiento (cm) de *B. cinerea* con el fungicida

A partir de valores de los porcentajes de inhibición micelial se estimó la concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ), es decir, la concentración que causa el 50 % de inhibición del crecimiento del micelio y la concentración efectiva para obtener un 90% del control del hongo ( $EC_{90}$ ) con análisis Probit utilizando el programa IBM SPSS Statistics v.23.

## Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial para determinar si existían diferencias significativas en la inhibición de la germinación de los conidios entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ) con los datos obtenidos en la evaluación de los halos de inhibición. A su vez, se determinó la existencia de diferencias significativas en la germinación de los conidios entre las cepas de *B. cinerea* para un tratamiento (producto) dado. Para aquellos tratamientos que mostraron diferencias significativas se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ).

Para determinar si había diferencias significativas en el crecimiento de las cepas de *B. cinerea* seleccionadas en presencia de distintas concentraciones de ciprodinil + fludioxonil (Switch®) se realizó un ANOVA. Para estimar el  $EC_{50}$  y  $EC_{90}$  del fungicida se realizó el análisis Probit y se usó el programa IBM SPSS Statistics v.23.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics v.23 (<https://spss.softonic.com>)

## Resultados

### 1.1. Evaluación por halo de inhibición

Todas las cepas nativas de *B. cinerea* evaluadas en este trabajo mostraron sensibilidad a los productos fungicidas, a excepción del extracto *M. alternifolia*.

Se observaron diferentes efectos de los productos evaluados sobre *B. cinerea* (Figura 5). El producto Syngenta, fue el que presentó mayor halo de inhibición frente a los 14 aislamientos, seguido por el producto fenexamida y en tercer lugar la mezcla ciprodinil + fludioxonil. Por su parte, los compuestos mezcla boscalid +pyraclostrobin y tebuconazol + fluopiram no presentaron diferencias significativas entre ellos y presentaron un halo de inhibición significativamente menor respecto a los productos anteriores, para 9 de los 14 aislamientos. El extracto de *M. alternifolia*, fue el que presentó la menor inhibición de la germinación de los conidios con respecto a los demás productos evaluados (Anexo) (Figura 5, Figura 6). Los compuestos mezcla boscalid + pyraclostrobin y tebuconazol + fluopiram no presentaron halo de inhibición definido para aislamientos B11, B32, B68, B69, B71, sino un micelio restringido. Por otra parte se observó que el efecto los productos Syngenta, fenexamida y ciprodinil + fludioxonil persistía en el tiempo durante 6 días (Figura 8), manteniendo la inhibición las mismas dimensiones.

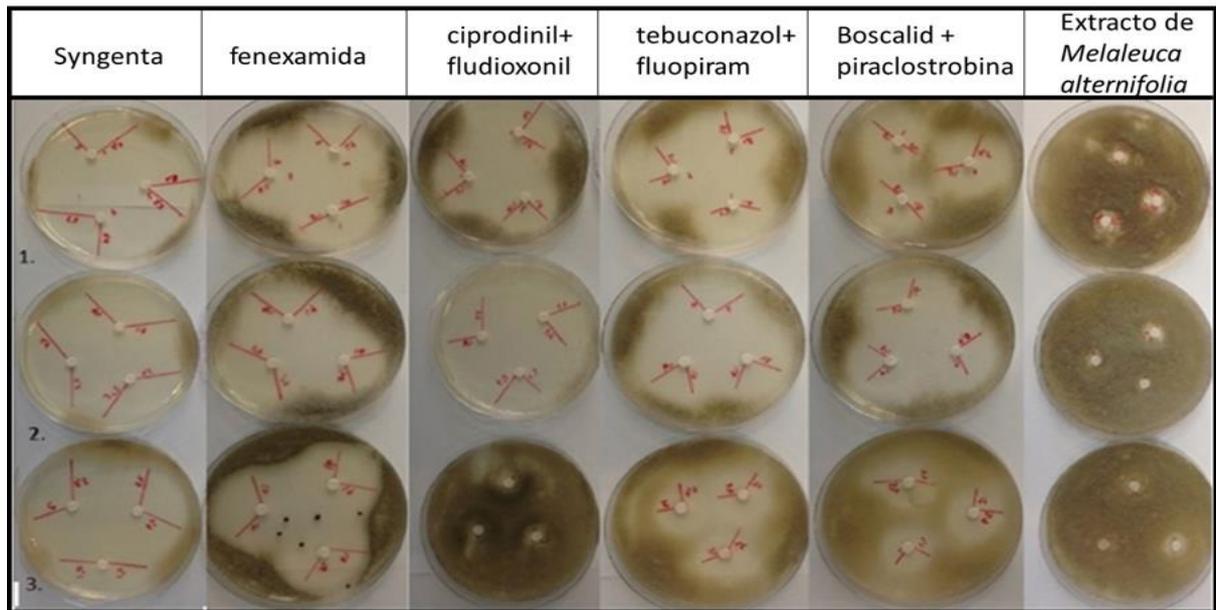


Figura 5. Efecto de los 6 productos evaluados sobre 3 aislamientos de *B. cinerea*.1: B67, 2: B49, 3: B63. Se observan los discos de papel y la presencia o ausencia de halo de inhibición de crecimiento de los aislamientos.

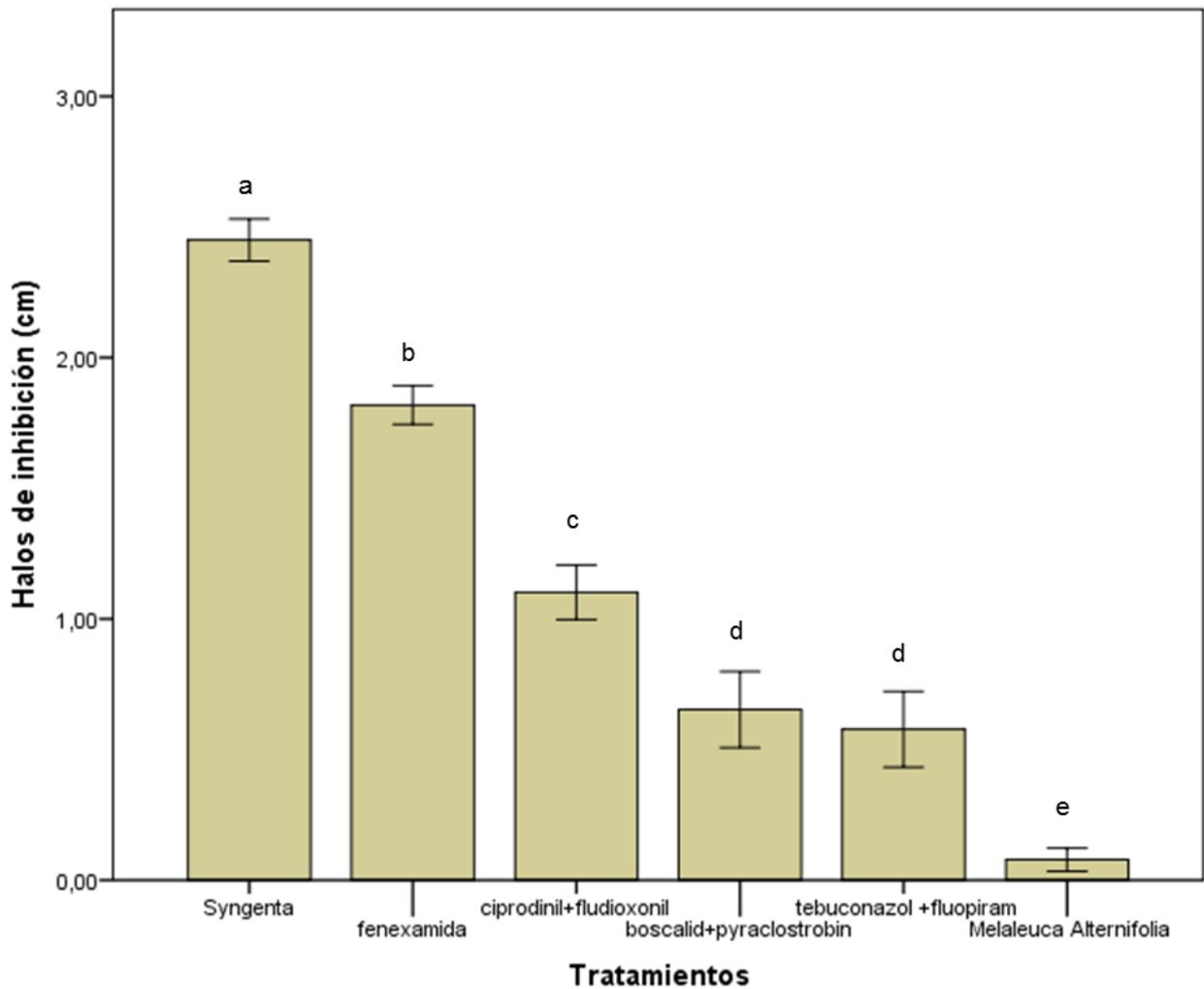
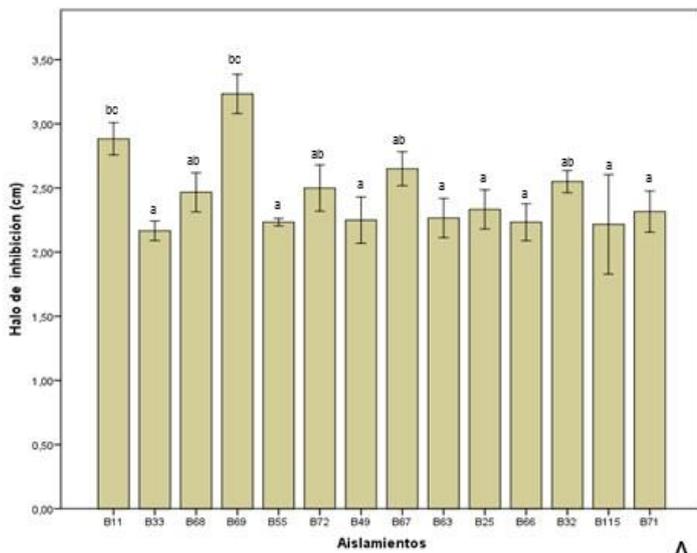


Figura 6. Promedios de los halos de inhibición de los 14 aislamientos de *B. cinerea* frente a cada tratamiento. Los valores seguidos por distinta letra en la columna presentan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Se observaron diferencias significativas entre las respuestas de algunos aislamientos evaluados para un mismo producto (Figura 7). Se observó además que, dentro del mismo aislamiento, existen diferencias para cada producto. Todos los aislamientos sometidos al producto experimental de Syngenta y al producto fenexamida presentaron una alta sensibilidad (Figura 7A y B). Los aislamientos B11, B32, B68, B69 y B71 no presentaron halo de inhibición

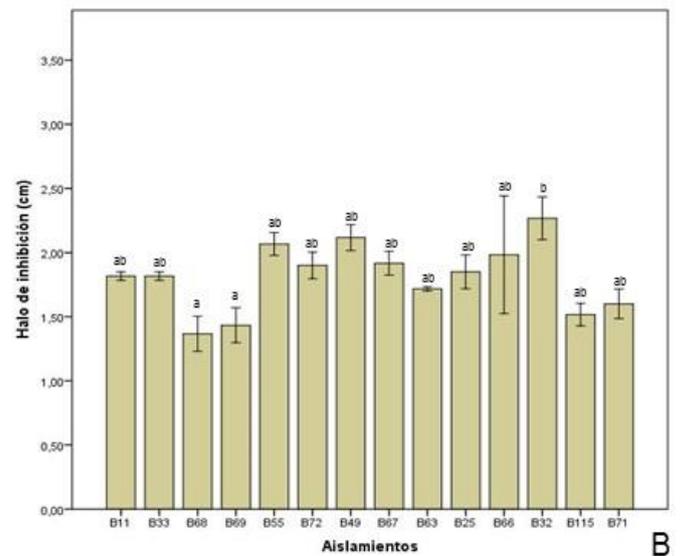
definido para los compuestos mezcla boscalid + pyraclostrobin y tebuconazol + fluopiram sino un micelio restringido. (Figura 7DyE).

Syngenta experimental



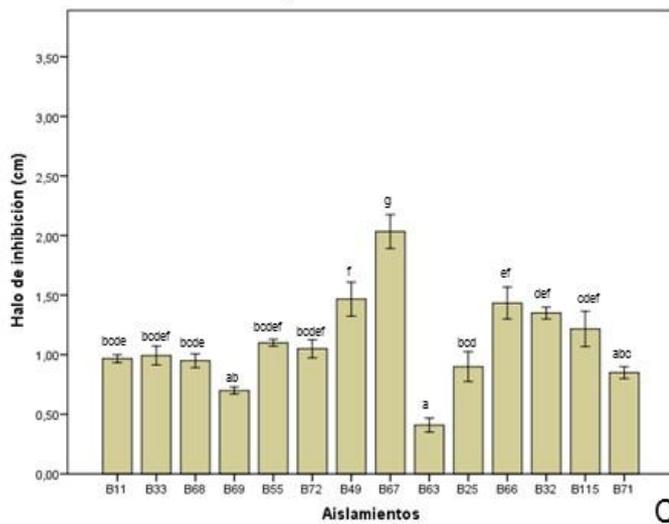
A

fenexamida



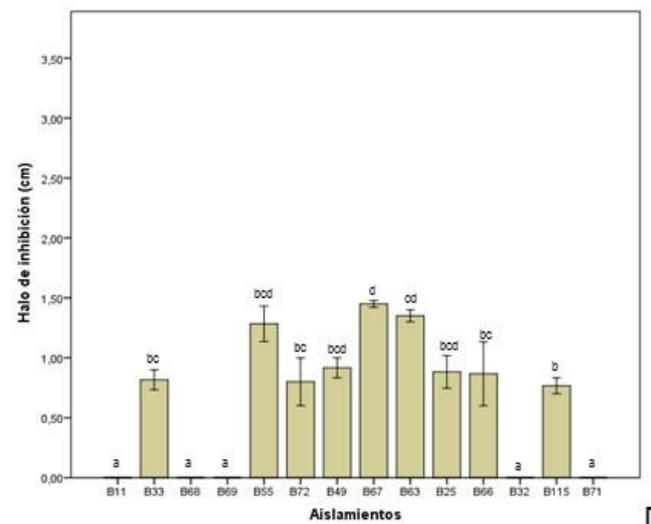
B

ciprodinil + fludioxonil



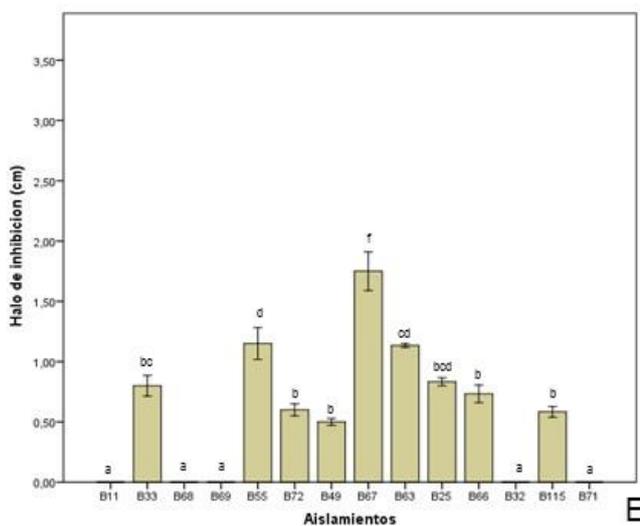
C

boscalid + pyraclostrobina



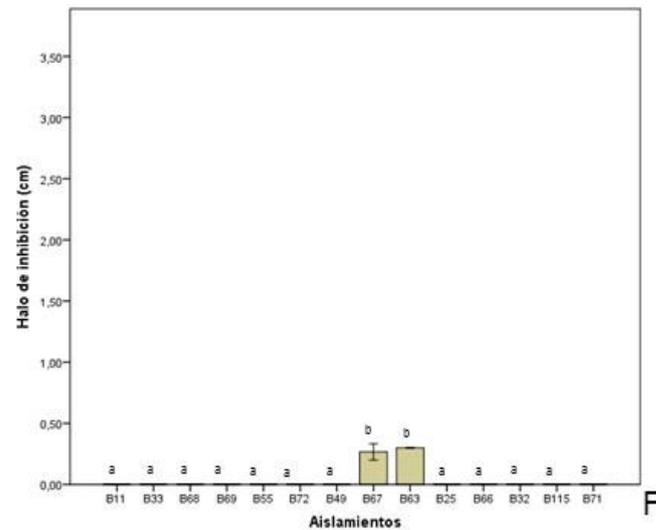
D

tebuconazol + fluopiram



E

Extracto de *Melaleuca alternifolia*



F

Figura 7. Medidas del halo de inhibición para cada aislamiento de *B. cinerea* frente a los diferentes productos; A: Syngenta experimental, B: fenhexamida, C: ciprodinil+ fludioxonil, D: boscalid + pyraclostrobina, E: tebuconazol+fluopiram, F: Extracto de *M.alternifolia*. Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## 1.2 Evaluación del efecto fungicida

Todos los tratamientos presentaron efecto fungicida excepto *Melaleuca alternifolia*.

Se determinó que los productos, fenhexamida, el producto experimental de Syngenta y ciprodinil + fludioxonil presentaron un 100 % de actividad fungicida frente a los 14 aislamientos, debido a que no hubo crecimiento al transferir las esporas expuestas al producto a un medio de cultivo PDA sin fungicida, luego de 3 días de incubación (Figura 8). El efecto del extracto de *M. alternifolia* sobre la germinación de los conidios luego de la siembra en medio de cultivo PDA, fue evaluado solo para los aislamientos B67 y B63, dado que fueron los únicos que mostraron algo de sensibilidad hacia el producto. El efecto de *M. alternifolia* se consideró fungistático ya que hubo crecimiento luego de sembrarlos en PDA.

Los productos mezcla boscalid +pyraclostrobin y tebuconazol + fluopiram presentaron un 100 % de actividad fungicida en 9 de los 14 aislamientos, debido a que B11, B32, B68, B71 mostraron una restricción del micelio (Figura 8)

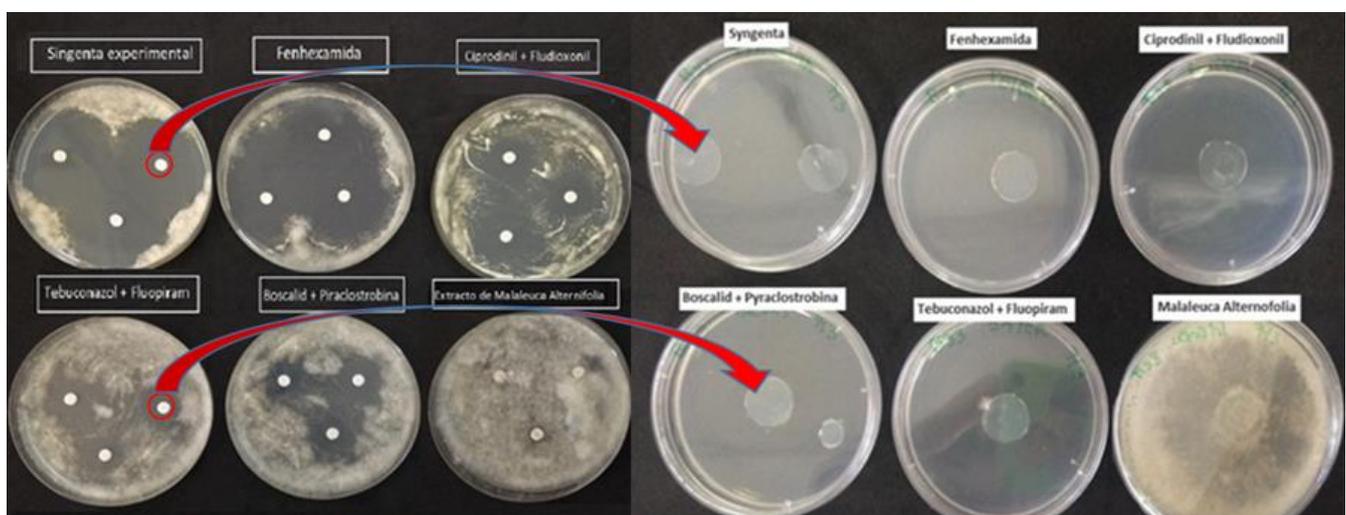


Figura 8. Efecto fungicida y fungistático, Izquierda halos de inhibición micelial frente a los distintos productos, Derecha transferencia con aguja estéril y bloque de agar de las esporas en la zona de inhibición a placas conteniendo medio PDA e incubación en estufa a 24 +/- 1°C durante 3 días.

Los fungicidas Syngenta (experimental) y ciprodinil+fludioxonil impidieron la germinación de las esporas de *B. cinerea*, mientras que, en presencia de fenexamida, tebuconazol+fluopiram y boscalid+piraclostrobina se observó la formación de tubo germinativo pero se inhibió la elongación del mismo y se produjo la pérdida de viabilidad (Figura 9).

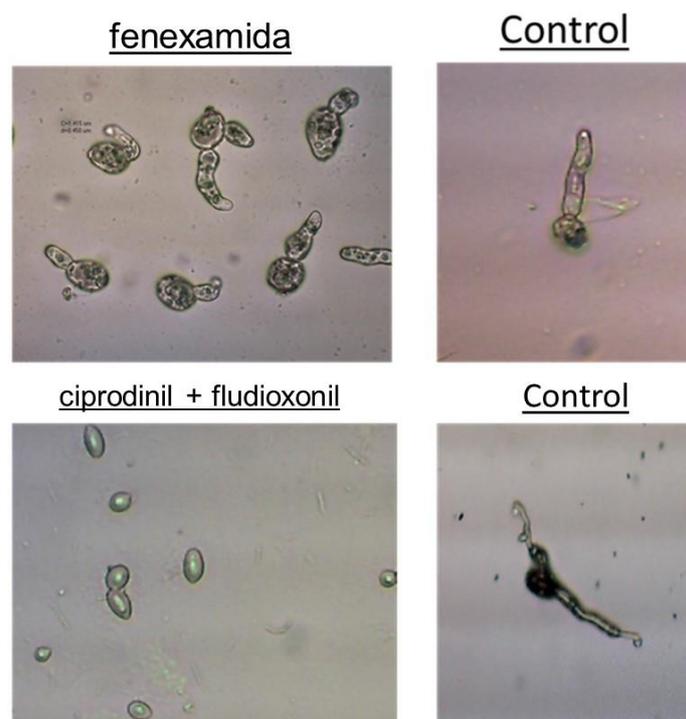


Figura 9. Formación y elongación del tubo germinativo observado bajo el microscopio x10 luego de 4 días de incubación. Esporas evaluadas con ciprodinil+fludioxonil : no germina ,fenexamida: si germinan. Control se observó luego de un día de plaqueada la espora.

### 1.3 Determinación de la concentración efectiva de inhibición del crecimiento micelial del fungicida ciprodinil + fludioxonil.

Con respecto a la inhibición del crecimiento micelial, producido por el producto fungicida ciprodinil + fludioxonil, en la concentración de 4400µg/ml (concentración recomendada) utilizada en campo, los aislamientos B33 B49 B71 resultaron ser sensibles y no presentaron crecimiento del micelio. A partir de la concentración  $4,4 \times 10^{-3}$  y  $4,4 \times 10^{-6}$  µg/ml de ciprodinil + fludioxonil, los aislamientos B33 B49 B71 mostraron crecimiento micelial, presentando los menores porcentajes de inhibición, siendo nulo en el aislamiento B71. Para cada uno de los aislamientos, no se observan diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del micelio de los tratamientos descriptos.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con respecto al testigo (T) de 3 aislamientos de *B. cinerea* seleccionados expuestos a cuatro concentraciones de ciprodinil+ fludioxonil luego de 4 días de incubación.

Aislamiento	Concentración (µg/ml)		Crecimiento micelial (cm)	Porcentaje de inhibición micelial (%)
B33	0	T	8,22±0,45	0
	4400	Cr	0,00±0,00	100a
	4,4		1,01±0,88	87,63a
	$4,4 \times 10^{-3}$		7,90±0,17	3,89b
	$4,4 \times 10^{-6}$		7,95±0,18	3,28b
B49	0	T	8,6±0,22	0
	4400	Cr	0,00±0,00	100a
	4,4		1,77±0,88	79,46b
	$4,4 \times 10^{-3}$		7,43±0,14	13,56c
	$4,4 \times 10^{-6}$		7,96±0,23	7,36c
B71	0	T	8,6±0,00	0
	4400	Cr	0,00±0,00	100a
	4,4		2,75±0,25	68,02b
	$4,4 \times 10^{-3}$		8,6±0,00	0c
	$4,4 \times 10^{-6}$		8,6±0,00	0c

T: Testigo: Crecimiento del micelio en ausencia de ciprodinil+fludioxonil. Cr: concentración recomendada. El crecimiento micelial se expresa como la media ± el desvío estándar de tres réplicas. Los porcentajes de inhibición

micelial para cada aislamiento, seguidas de diferente letra indican que existen diferencias significativas entre ellos, de acuerdo a la prueba de Tukey (HSD) ( $p \leq 0.05$ ).

A partir del análisis probit, se determinó la concentración efectiva media de cirprodinil + fludioxonil, fue de 0.66  $\mu\text{g/ml}$  ( $EC_{50}$ ) y la concentración efectiva para inhibir el 90% del crecimiento del micelio ( $EC_{90}$ ), fue de 16,03  $\mu\text{g/ml}$  (Anexo).

## Discusión

Los datos aportados en este estudio permiten afirmar la existencia de diferencias en la sensibilidad de los diferentes aislamientos de *B.cinerea* frente a distintos productos fungicidas comerciales recomendados para su control en campo en Uruguay. Los resultados obtenidos sugieren que todos los productos evaluados en este trabajo son eficaces para el control del patógeno en condiciones *in vitro* excepto el producto orgánico extracto de *Melaleuca alternifolia*. No se encontraron aislamientos de *B.cinerea* resistentes para ninguno de los fungicidas evaluados. Si bien todos los aislamientos fueron sensibles, se encontraron variaciones en las respuestas de los aislamientos a un mismo producto, demostrando que existe variabilidad en la población, hecho que es frecuente dado que se trata de una especie que presenta reproducción asexual. El producto que presentó mejores resultados para el control de este patógeno es el experimental de Syngenta. Estos resultados concuerdan con lo observado a campo por Alonso et al. (2016) en estudios de campo sobre parcelas experimentales donde se aplicaron los mismos productos y se evaluó incidencia y severidad de podredumbres por *Botrytis* sp. en racimos. En Uruguay el producto experimental de Syngenta no está disponible en el mercado, por lo que a partir de estos resultados sería recomendable su incorporación al mercado local. El otro fungicida que mostró gran eficiencia fue la fenexamida. Este fungicida es clave a la hora de diferenciar los genotipos de las dos especies simpátricas *B.cinerea* y *B.pseudocinerea* ya que los mismos no presentan caracteres morfológicos significativamente distintas para su diferenciación y una de las pocas evidencias que confirmó que son dos especies distintas fue la diferencia encontrada en la especie *B.pseudocinerea* que presenta resistencia natural al fungicida fenexamida (Walker et

al., 2011). Los aislamientos analizados corresponderían a *Botrytis cinerea sensu stricto*, ya que en ninguno de los 14 aislamientos se evidenció resistencia a fenexamida, estos resultados coinciden con los encontrados por Del Palacio et al., 2017, donde se analizaron las características genéticas de los aislamientos utilizados en este trabajo concluyendo que son de *B.cinerea sensu stricto*.

El tercer producto que mostró muy buenos resultados para el control de las cepas nativas de *B. cinerea* es ciprodinil + fludioxonil. Los compuestos mezcla boscalid +pyraclostrobin y tebuconazol + fluopiram mostraron menor eficiencia y no presentaron diferencias significativas entre ellos. El extracto de *Melaleuca alternifolia* mostro escaso efecto frente a los distintos aislamientos, estos resultados coinciden con los encontrados por Alburqueque & Gusqui, 2018 donde evaluaron la eficacia del extracto de *M.alternifolia* sobre el crecimiento de *B.cinerea* y encontraron que este provocaba el menor porcentaje de inhibición micelial (35%) para *Botrytis* comparados con la eficacia de otros fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas.

La utilización de productos químicos de síntesis es el sistema más utilizado para el control de las podredumbres fúngicas, pero actualmente cada vez son mayores los problemas de orden higiénico-sanitarias que éstos plantean, ya que los fungicidas se presentan como potenciales agentes oncogénicos cuando son aplicados en las frutas y verduras (Viñas et al., 2006). La proximidad temporal entre la aplicación de los fungicidas y el consumo del producto es un grave problema que hay que abordar para evitar el efecto de los residuos químicos en la salud humana.

Si bien los resultados obtenidos en este trabajo y por otros autores muestran que el extracto de *M. alternifolia* es menos eficiente que los fungicidas sintéticos para el

control de *B.cinerea*, podría ser utilizado como tratamiento complementario en momentos cercanos a la cosecha donde la aplicación de fungicidas de síntesis no es recomendada por los residuos que pueden permanecer en la fruta.

Se pudo observar que todos los productos evaluados (excepto el extracto de *Melaleuca alternifolia*) tienen efecto “cida” en las concentraciones recomendadas, denominándolos entonces como fungicidas. Este patógeno presenta un alto flujo genético debido a su distribución geográfica, su variedad de elementos extracromosómicos y a su amplio rango de hospedantes (Distribución y Utilización de Plaguicidas Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas, 2012). Todas estas características han hecho a *Botrytis* un patógeno muy exitoso, teniendo en cuenta las grandes pérdidas generadas por este fitopatógeno, la industria en su búsqueda de eliminar los problemas causado por el mismo, ha incrementado la frecuencia en la aplicación de fungicidas o el uso inapropiado de las dosis lo que lleva a la generación de resistencia frente a estos fungicidas. Por lo que surge la necesidad de evaluar en forma continua los diversos productos que tengan capacidad de ejercer un efectivo control sobre este hongo. Aunque ya estén catalogados como tales, es de gran utilidad volver a evaluar su efecto en cepas nativas de *Botrytis sp.*

La germinación de las esporas frente a fenexamida, boscalid + pyraclostrobina y tebuconazol + fluopiram no se vio afectada ya que en todos los casos se observó germinación de las mismas. Esto difiere de lo observado por Rosslenbroich y Stuebler, 2000 donde se plantean que para el fenexamida la germinación de esporas es inhibida cuando se aplican concentraciones relativamente altas. Por otro lado, se corroboró que son fuertes inhibidores de las etapas de desarrollo del tubo germinativo de *Botrytis sp.*

La ausencia de germinación de las esporas frente al fungicida ciprodinil + fludioxonil concuerda con lo encontrado por Rosslenbroich & Stuebler, 2000. Dentro de la familia de las anilinopirimidinas, que es representada por el cyprodinil en este experimento, se ha descrito que no afectan la germinación de la spora, pero inhiben la elongación del tubo germinativo y el crecimiento micelial de *B. cinerea*, al menos in vivo por lo que la característica o propiedad de inhibir la germinación de las esporas estaría dada por el fungicida fludioxonil perteneciente a la familia de los fenilpirroles (Kim et al., 2016).

La variabilidad presentada entre los distintos aislamientos, frente a un mismo producto se puede interpretar de distintas maneras. Según Grindle (1979), la variabilidad se explica principalmente por la anastomosis que pueden producirse entre las hifas del hongo y que dan lugar a células multinucleadas y generalmente heterocarióticas. En estudios realizados en Francia se estableció que dependiendo del genotipo, el comportamiento del patógeno puede variar. Los aislamientos genotipo transposa se comportan de manera más estable y uniforme durante todo el año incrementando su potencial patogénico durante la cosecha (Martinez et al., 2003). Se asocian preferentemente a infecciones del racimo mientras que los aislamientos genotipo vacuma se presentan como una población más heterogénea, menos estable y asociada a infecciones de follaje, presentándose mayoritariamente al inicio de la brotación a la floración de la vid y corresponderían a poblaciones migratorias (Giraud et al., 1999, 1997; Martinez et al., 2003).

La variabilidad genética, variedad de elementos extracromosómicos, amplio rango de hospedantes y la potencial recombinación genética ocurrida en la naturaleza podría ser una de las razones del por qué iguales estrategias de control no otorgan los resultados esperados (Distribución y Utilización de Plaguicidas Directrices sobre

la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas 2012). La identificación de la variabilidad genética de las poblaciones de *Botrytis* es esencial para estudiar el comportamiento diferencial de los genotipos con respecto a la sensibilidad a ciertos ingredientes activos de fungicidas.

Con respecto a la inhibición del crecimiento del micelio provocada por el producto Switch (ciprodinil + fludioxonil), el valor de la  $EC_{90} = 16,03 \mu\text{g/ml}$  obtenido en este trabajo es similar al señalado por Ayoub y colaboradores (2017) quienes estudiaron la actividad anti fúngica in vitro de los fungicidas SWITCH (37.5% de ciprodinil and 25% fludioxonil) y SIGNUM(26.7% boscalid y 6.7% pyraclostrobine) combinados con ácido peroxiacético (PERACELAN®5) donde el 100% de la inhibición de crecimiento del micelio fue obtenido con valores de  $14.47 \mu\text{g/ml}$  de SWITCH (37.5% de ciprodinil and 25% fludioxonil) y 1.5% de PERACELAN®5. Los valores encontrados en este trabajo son resultados de ensayos in vitro, con condiciones controladas, la evaluación de la eficacia de los productos en campo tiene muchas más interferencias y resulta más compleja; por lo que una primera evaluación in vitro siempre nos dirige hacia los productos más eficaces. Un producto que es eficaz in vitro no necesariamente lo será en campo pues en su actuación influyen factores como la degradabilidad, persistencia, etc. Sin embargo, si un producto no es útil in vitro difícilmente lo será en campo (Gonzales, 2005).

Con la finalidad de evaluar la efectividad del producto formulado con concentraciones más bajas que las recomendadas y con los datos aportados en este trabajo se podría inferir que a concentraciones más bajas ( $4,4 \mu\text{g/ml}$ ) que las recomendadas ( $4400 \mu\text{g/ml}$ ) de ciprodinil+fludioxonil se logran resultados similares de inhibición, con un

porcentaje de inhibición mayor al 70%, con menos gastos de inversión de producto y menor efecto residual. Por lo que se debería evaluar la utilización de concentraciones más bajas en campo, contribuiría a una reducción en la aplicación de fungicidas y como consecuencia reducción en los costos de producción y en los residuos químicos sobre el fruto.

## Conclusiones

- Los datos sugieren que frente a un mismo grupo de aislamientos expuesto a estos productos, el más eficiente para inhibir la germinación de conidios de *B.cinerea* es el producto experimental de Syngenta.
- Todos los productos evaluados tienen un gran potencial para el control de *B.cinerea* con las concentraciones utilizadas excepto el extracto de *Melaleuca alternifolia*.
- Todos los productos químicos evaluados presentaron acción fungicida frente a la mayoría de los aislamientos de *B.cinerea*
- Todas las cepas son susceptibles a la fenexamida, lo que concuerda con que pertenecen al Grupo II (*B. cinerea sensu stricto*).
- La aplicación del producto ciprodinil+ fludioxonil a concentraciones 3 ordenes (4,4 µg/ml) menores a la concentración recomendada generó un porcentaje de inhibición relativamente similares con respecto a la aplicación de la concentración recomendada (4400 µg/ml) lo que indica que sería posible una disminución en las concentraciones aplicadas a campo obteniendo similares resultados de control contra el patógeno *B.cinerea*.

## Bibliografía

- Acuña, I. (2008). TARDÍO Y ESTRATEGIAS DE CONTROL QUÍMICO. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, (64).
- Alburquerque Andrade, D., & Gusqui Mata, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldo*, 25(2), 489-498.
- Alonso, R., Tiscornia, S., Pan, D., del Palacio, A., Bettucci, L. & Lupo, S XXV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, XIX Congreso Latinoamericano de Fitopatología, LVII APS Caribbean Division Meeting 2-5 octubre de 2017 Podredumbre de uva Tannat por *Botrytis cinerea*: evaluación de estrategias de manejo para su control. Poster
- Ayoub, F., Ben oujji, N., Chebli, B., Ayoub, M., Hafidi, A., Salghi, R., & Jodeh, S. (2017). Antifungal effectiveness of fungicide and peroxyacetic acid mixture on the growth of *Botrytis cinerea*. *Microbial Pathogenesis*, 105, 74–80.
- Bach, J., Hugon, M., Malosse, C., & Leroux, P. (2001). The hydroxylanilide fenhexamid , a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* ( *Botrytis cinerea* ), *Pest Management Science*, 1060–1067.
- Bayer, S. A. (2017). Luna experience 400 sc.
- Bowen, N. J., & Jordan, I. K. (2002). Transposable Elements and the Evolution of Eukaryotic Complexity, 65–76.
- Campia, P., Venturini, G., Moreno-Sanz, P., Casati, P., & Toffolatti, S. L. (2017). Genetic structure and fungicide sensitivity of *Botrytis cinerea* populations isolated from grapevine in northern Italy. *Plant Pathology*, 66(6), 890–899.
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 3(1), 1–30.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A., & Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 1–10.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430.
- Del Palacio A. Alonso,R., Lupo,S. Pan D., Tiscornia S. & Bettucci L. IX Congreso Latinoamericano de Micología, Lima, Perú agosto 2017 Caracterización molecular de cepas de *Botrytis cinerea* de uvas de la variedad Tannat. Poster
- Derckel, J.-P., Baillieul, F., Manteau, S., Audran, J.-C., Haye, B., Lambert, B., & Legendre, L. (1999). Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 89(3), 197–203.
- Dewey, F. M., Hill, M., & DeScenzo, R. (2008). Quantification of *Botrytis* and laccase

- in winegrapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(1), 47–54.
- Deytieux-Belleau, C., Geny, L., Roudet, J., Mayet, V., Donèche, B., & Fermaud, M. (2009). Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 125(4), 551–563.
- Doss, R. P. (1999). Composition and Enzymatic Activity of the Extracellular Matrix Secreted by Germlings of *Botrytis cinerea* These include : Composition and Enzymatic Activity of the Extracellular Matrix Secreted by Germlings of *Botrytis cinerea* †, 65(2), 404–408.
- Doss, R. P., Potter, S. W., Soeldner, A. H., Christian, J. K., & Fukunaga, L. E. (1995). Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea* . These include : Adhesion of Germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 260–265.
- Elad, Y. B. W. N. D. (2007). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*.
- Esterio, M., Ramos, C., Walker, A.-S., Fillinger, S., Leroux, P., & Auger, J. (2012). Phenotypic and genetic characterization of *B. cinerea* Chilean isolates of different levels of fenhexamid sensitivity. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(3), 414–420.
- Fekete, É., Fekete, E., Irinyi, L., Karaffa, L., Árnayasi, M., Asadollahi, M., & Sándor, E. (2012). Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. *Microbiological Research*, 167(5), 283–291.
- Ferrer, M., González-Neves G., Echeverría G., CamussiG, I., Rusley, A., Salvarrey, J., Favre G. & Fourment, M. (2011). Comportamiento agronómico y potencial enológico de la uva Tannat en tres regiones climáticas uruguayas. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 37–49.
- Ferrer M, González-Neves G, Echeverría G, Camussi G, Avondet A, Fourment M, Favre G, Salvarrey J.2011a. Efecto del estrés climático sobre la respuesta de la planta y la composición de la uva Tannat (*Vitis vinifera*L.) en viñedos del Uruguay. *Enología*, 7: 1-12.
- Filingier & Walker. (2016). *Chemical Control and Resistance Management of Botrytis Diseases*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- FRAC. (2017). FRAC Code List 2017: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). *FRAC - Fungicide Resistance Action Committee*, 1–12.
- Gepp, V., Vero, S., Cassanello María, E., Romero, G., Silvera, E., González, P., ... Bentancur, O. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* in Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 16(Mic), 97–107.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K., & Brygoo, Y. (1999). Two Sibling Species of the *Botrytis cinerea* Complex , *transposa* and *vacua* , Are Found in Sympatry on Numerous Host Plants. *Ecology and Population Biology*, 89(10), 967–973.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., & Brygoo, Y. (1997). RFLP markers show genetic recombination (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal

- two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 1177–1185.
- Gonzales, A.J (2005) Ensayos de efectividad de fungicidas in vitro frente a hongos de suelo. Utilidad para el conocimiento de las resistencias y el establecimiento de una pauta terapéutica adecuada. *Phytoma* Nº 173, 15-19
- GRINDLE, M. (1978). Phenotypic Differences Between Natural and Induced Variants. *Journal of General Microbiology*, (1979), 109–120.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 853–860.
- Jackson, D. I., Lombard, P. B., & Kabinett, L. Q. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 409–430.
- Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., & Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic Change*, 73(3), 319–343.
- Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A. E., Kan, J. A. L. Van, & Group, F. G. (2005). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal*, 213–225.
- Keller, M., Viret, O., & Cole, F. M. (2003). *Botrytis cinerea* Infection in Grape Flowers: Defense Reaction, Latency, and Disease Expression. *PHYTOPATHOLOGY*, 93(3), 316–322.
- Kim, J.-O., Shin, J.-H., Gumilang, A., Chung, K., Choi, K. Y., & Kim, K. S. (2016). Effectiveness of Different Classes of Fungicides on *Botrytis cinerea* Causing Gray Mold on Fruit and Vegetables. *The Plant Pathology Journal*, 32(6), 570–574.
- Kumari, S., Tayal, P., Sharma, E., & Kapoor, R. (2014). Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates. *Microbiological Research*, 169(11), 862–872.
- Ky, I., Lorrain, B., Jourdes, M., Pasquier, G., Fermaud, M., Gény, L., Teissedre, P. L. (2012). Assessment of grey mould (*Botrytis cinerea*) impact on phenolic and sensory quality of Bordeaux grapes, musts and wines for two consecutive vintages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(2), 215–226.
- Latorre, B. A., Lillo, M. E. R. C., & C, R. (2002). Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. *Ciencia e Investigación Agraria*, 29(Y 2016), 145–152.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., & Fermaud, M. (2003). Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*, *European Journal of Plant Pathology* 109: 479–488.
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844–1855.
- Molitor, D., Rothmeier, M., Behr, M., Fischer, S., Hoffmann, L., & Evers, D. (2011). Crop cultural and chemical methods to control grey mould on grapes. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 50(2), 81–87.

- MUNOZ, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., & Giraud, T. (2002). Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in. *Mycol. Res*, 106(May), 594–601.
- Myresiotis, C. K., Bardas, G. A., Karaoglanidis, G. S., & Agri-, F. (2008). Baseline Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Pyraclostrobin and Boscalid and Control of Anilinopyrimidine- and Benzimidazole-Resistant Strains by These Fungicides *Plant Dis.* 92:1427-1431.
- Nair, N. G., Guilbaud-Oultorfi, S., Barchia, I., & Emmett, R. (1995). Significance of carry over inoculum, flower infection and latency on the incidence of botrytis cinerea in berries of grapevines at harvest in new south wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 35(8), 1177–1180.
- Pokorny, A., Science, P., Smilanick, J., & Xiao, C. (2016). Determination of Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry in the Central Coast region of California. *Plant Health Prog.* 17:30-34.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., & Doneche, B. (2006). *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2 nd Edition Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2 nd Edition Pascal Rib ´* (2nd ed., Vol. 1). France.
- Rosewich, U. L., & Kistler, H. C. (2000). Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:325–63
- Rosslensbroich, H. J., & Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea* - History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19(8–10), 557–561.
- Sesan, T. E., Enache, E., Iacomi, B. M., Oprea, M., Oancea, F., & Iacomi, C. (2015). ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SOME PLANT EXTRACTS AGAINST *Botrytis cinerea* Pers. IN THE BLACKCURRANT CROP (*Ribes nigrum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 14(1), 29–43.
- Staats, M., Van Baarlen, P., & Van Kan, J. A. L. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22(2), 333–346
- Steel, C. C., Blackman, J. W., & Schmidtke, L. M. (2013). Grapevine bunch rots: Impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5189–5206.
- Steel, C.C., Savocchia, S. and Greer, L.A. (2016). Management of bunch rot diseases of grapes in sub-tropical vineyards in Australia. *Acta Hort.* 1115, 265-272
- Switch. (2010). Ficha técnica, (23), 1–20.
- Tardaguila, J., Blanco, J. A., Poni, S., & Diago, M. P. (2012). Mechanical yield regulation in winegrapes: Comparison of early defoliation and crop thinning. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(3), 344–352.
- Van Kan, J. A. L. (2005). Infection strategies of *Botrytis cinerea*. *Acta Horticulturae*,

669, 77–90.

- Veloukas, T., & Agriculture, F. (2011). Detection and Molecular Characterization of Boscalid-Resistant *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry. *Plant Disease*, 95(10), 1302–1307.
- VERCESI, A. , SILVIA LAURA TOFFOLATTI, GIOVANNI VENTURINI, P. C. and S. S. D. (2014). Characterization of *Botrytis cinerea* populations associated with treated and untreated cv. Moscato vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(3), 478–489.
- Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V. G., & Cole, F. M. (2004). *Botrytis cinerea* Infection of Grape Flowers: Light and Electron Microscopical Studies of Infection Sites. *Phytopathology*, 94(8), 850–857.
- Walker, A.-S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., ... Fournier, E. (2011). *Botrytis pseudocinerea* , a New Cryptic Species Causing Gray Mold in French Vineyards in Sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 101(12), 1433–1445.
- Weber, R. W. S., & Hahn, M. (2011). A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis* A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. *Source: Journal of Plant Diseases and Protection*, 118(1181), 17–25.
- Willetts, H. J., & Bullock, S. (1992). Developmental biology of sclerotia. *Mycological Research*, 96(10), 801–816.
- Williamson, B., Duncan, G. H., Harrison, J. G., Harding, L. A., Elad, Y., & Zimand, G. (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 99(11), 1303–1310.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580.

## Anexo

### Anova y test de Tukey para los distintos fungicidas.

#### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	53,959	5	10,792	68,839	,000
Dentro de grupos	12,228	78	,157		
Total	66,188	83			

#### PRUEBA DE TUKEY

##### HSD Tukey<sup>a</sup>

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		e	d	c	b	a
6	14	,0786				
5	14		,5774			
4	14		,6531			
3	14			1,1019		
2	14				1,8183	
1	14					2,4502
Sig.		1,000	,996	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 14,000.

1:Singenta,2:Fenhexamida,3: ciprodinil+fludioxonil, 4:Boscalid+Pyraclostrobin,5:Tebuconazol+fluopiram, 6:extracto de *Malaleuca alternifolia*

Tabla 1. Medidas de los halos de inhibición del producto experimental de Syngenta frente a 14 aislamientos de *B.cinerea*

Aislamientos	Syngenta	
	cm	± ds
B11	2,88	± 0,13bc
B33	2,16	± 0,13a
B68	2,47	± 0,15ab
B69	3,23	± 0,15c
B55	2,23	± 0,03
B72	2,5	± 0,18ab
B49	2,45	± 0,35a
B67	2,65	± 0,13ab
B63	2,27	± 0,15a
B25	2,33	± 0,15a
B66	2,23	± 0,14a
B32	2,55	± 0,09ab
B115	2,22	± 0,39a
B71	2,32	± 0,16a

Los datos son mostrados como la media de los halos de inhibición de tres replicas expresadas en cm ± desvío estándar. . Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,563	13	,274	9,514	,000
Dentro de grupos	,807	28	,029		
Total	4,370	41			

### Test de Tukey

HSD Tukey<sup>a</sup>

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		a	b	c
B33	3	2,1667		
B115	3	2,2167		
B66	3	2,2333		

B55	3	2,2333		
B49	3	2,2500		
B63	3	2,2667		
B71	3	2,3167		
B25	3	2,3333		
B68	3	2,4667	2,4667	
B72	3	2,5000	2,5000	
B32	3	2,5500	2,5500	
B67	3	2,6500	2,6500	
B11	3		2,8833	2,8833
B69	3			3,2333
Sig.		,073	,194	,427

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 2. Medidas de los halos de inhibición del producto fenexamida frente a 14 aislamientos de *B.cinerea*

Aislamientos	fenexamida		
	cm	±	Ds
B11	1,81	±	0,10ab
B33	1,81	±	0,08ab
B68	1,37	±	0,24a
B69	1,43	±	0,24 a
B55	2,07	±	0,15ab
B72	1,90	±	0,18ab
B49	1,80	±	0,18ab
B67	1,92	±	0,16ab
B63	1,72	±	0,03ab
B25	1,85	±	0,23ab
B66	1,98	±	0,79ab
B32	2,37	±	0,25b
B115	1,52	±	0,15ab
B71	1,60	±	0,20ab

Los datos son mostrados como la media de los halos de inhibición de tres replicas expresadas en cm ± desvió estándar. . Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey (p≤0.05).

### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,691	13	,207	2,729	,013
Dentro de grupos	2,123	28	,076		
Total	4,814	41			

### Test de Tukey

HSD Tukey<sup>a</sup>

cepas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		a	b
B68	3	1,3667	
B69	3	1,4333	
B115	3	1,5167	1,5167
B71	3	1,6000	1,6000
B63	3	1,7167	1,7167
B11	3	1,8167	1,8167
B33	3	1,8167	1,8167
B25	3	1,8500	1,8500
B72	3	1,9000	1,9000
B67	3	1,9167	1,9167
B66	3	1,9833	1,9833
B55	3	2,0667	2,0667
B49	3	2,1167	2,1167
B32	3		2,2667
Sig.		,101	,101

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 4. Medidas de los halos de inhibición del producto Ciprodinil + fludioxonil frente a 14 aislamientos de *B.cinerea*

Aislamientos	ciprodinil + fludioxonil	
	cm	± Ds*
B11	0,97	± 0,06a
B33	1,15	± 0,09a
B68	0,95	± 0,1a
B69	0,7	± 0,05a
B55	1,1	± 0,05a
B72	1,05	± 0,13a
B49	1,67	± 0,2 a
B67	2,03	± 0,25a
B63	0,42	± 0,1b
B25	0,9	± 0,22c
B66	1,43	± 0,23d
B32	1,35	± 0,09d
B115	1,22	± 0,26d
B71	0,85	± 0,09d

Los datos son mostrados como la media de los halos de inhibición de tres replicas expresadas en cm ± desvío estándar. . Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey (p≤0.05).

#### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5,957	13	,458	17,427	,000
Dentro de grupos	,736	28	,026		
Total	6,693	41			

#### Test de Tukey

HSD Tukey<sup>a</sup>

cepa	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		a	b	c	d	e	f	g
B63	3	,4100						
B69	3	,7000	,7000					
B71	3	,8500	,8500	,8500				

B25	3		,9000	,9000	,9000				
B68	3		,9500	,9500	,9500	,9500			
B11	3		,9667	,9667	,9667	,9667			
B33	3		,9933	,9933	,9933	,9933	,9933		
B72	3		1,0500	1,0500	1,0500	1,0500	1,0500		
B55	3		1,1000	1,1000	1,1000	1,1000	1,1000		
B115	3			1,2167	1,2167	1,2167	1,2167		
B32	3				1,3500	1,3500	1,3500		
B66	3					1,4333	1,4333		
B49	3						1,4667		
B67	3							2,0333	
Sig.			,104	,189	,294	,089	,051	,061	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 5. Medidas de los halos de inhibición del producto boscalid + pyraclostrobina frente a 14 aislamientos de *B.cinerea*

Aislamiento	boscalid + pyraclostrobina		
	cm	±	ds
B11	0,00	±	0,00a
B33	0,97	±	0,23b
B68	0,00	±	0,00a
B69	0,00	±	0,00a
B55	1,28	±	0,26bcd
B72	0,80	±	0,33bc
B49	1,83	±	0,21bcd
B67	1,45	±	0,05d
B63	1,35	±	0,09cd
B25	0,88	±	0,24bcd
B66	0,86	±	0,46bc
B32	0,00	±	0,00a
B115	0,77	±	0,12b
B71	0,00	±	0,00

Los datos son mostrados como la media de los halos de inhibición de tres replicas expresadas en cm ± desvío estándar. Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**ANOVA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11,640	13	,895	24,106	,000
Dentro de grupos	1,040	28	,037		
Total	12,680	41			

**Test de Tukey**

cepa	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		a	b	c	D
B11	3	,0000			
B68	3	,0000			
B69	3	,0000			
B32	3	,0000			
B71	3	,0000			
B115	3		,7667		
B72	3		,8000	,8000	
B33	3		,8167	,8167	
B66	3		,8667	,8667	
B25	3		,8833	,8833	,8833
B49	3		,9167	,9167	,9167
B55	3		1,2833	1,2833	1,2833
B63	3			1,3500	1,3500
B67	3				1,4500
Sig.		1,000	,113	,072	,057

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 6. Medidas de los halos de inhibición del producto tebuconazol + fluopiram frente a 14 aislamientos de *B.cinerea*

Aislamientos	tebuconazol + fluopiram		
	cm	±	ds
B11	0,00	±	0,00a
B33	1,15	±	0,18b
B68	0,00	±	0,00c
B69	0,00	±	0,00c
B55	1,15	±	0,23d
B72	0,60	±	0,09e
B49	0,50	±	0,19e
B67	1,75	±	0,28f
B63	1,13	±	0,03g
B25	0,83	±	0,06g
B66	0,73	±	0,13g
B32	0,00	±	0,00h
B115	0,58	±	0,08i
B71	0,00	±	0,00j

Los datos son mostrados como la media de los halos de inhibición de tres replicas expresadas en cm ± desvió estándar. . Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11,474	13	,883	65,612	,000
Dentro de grupos	,377	28	,013		
Total	11,851	41			

**Test de Tukey**

cepa	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		a	b	c	d	f
B11	3	,0000				
B68	3	,0000				
B69	3	,0000				
B32	3	,0000				
B71	3	,0000				
B49	3		,5000			
B115	3		,5833			
B72	3		,6000			
B66	3		,7333			
B33	3		,8000	,8000		
B25	3		,8333	,8333	,8333	
B63	3			1,1333	1,1333	
B55	3				1,1500	
B67	3					1,7500
Sig.		1,000	,068	,068	,100	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

## Análisis probit para ciprodinil + fludioxonil SWICTH.

Límites de confianza							
	Probabilidad	95% de límites de confianza para concentración			95% de límites de confianza para logaritmo(concentración) <sup>a</sup>		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	,098	.	.	-1,009	.	.
	,020	,142	.	.	-,848	.	.
	,030	,180	.	.	-,745	.	.
	,040	,215	.	.	-,668	.	.
	,050	,248	.	.	-,606	.	.
	,060	,280	.	.	-,553	.	.
	,070	,312	.	.	-,506	.	.
	,080	,343	.	.	-,464	.	.
	,090	,375	.	.	-,426	.	.
	,100	,406	.	.	-,391	.	.
	,150	,567	.	.	-,246	.	.
	,200	,740	.	.	-,131	.	.
	,250	,929	.	.	-,032	.	.
	,300	1,139	.	.	,057	.	.
	,350	1,376	.	.	,139	.	.
	,400	1,647	.	.	,217	.	.
	,450	1,960	.	.	,292	.	.
	,500	2,325	.	.	,367	.	.
	,550	2,759	.	.	,441	.	.
	,600	3,283	.	.	,516	.	.
	,650	3,929	.	.	,594	.	.
	,700	4,748	.	.	,676	.	.
	,750	5,824	.	.	,765	.	.
	,800	7,312	.	.	,864	.	.
	,850	9,532	.	.	,979	.	.
	,900	13,307	!	!	1,124	.	.
	,910	14,424	!	!	1,159	.	.
	,920	15,743	.	.	1,197	.	.
	,930	17,334	.	.	1,239	.	.
	,940	19,302	.	.	1,286	.	.
	,950	21,819	.	.	1,339	.	.

	,960	25,200	.	.	1,401	.	.
	,970	30,083	.	.	1,478	.	.
	,980	38,068	.	.	1,581	.	.
	,990	55,170	.	.	1,742	.	.

a. Base de logaritmo = 10.

Tabla .Medidas de los halos de inhibición de los 14 aislamientos de *B.cinerea* (B11-B71) frente a 6 productos. Las medidas son expresadas en cm desde el centro del disco hasta el comienzo de la formación de micelio

Aislamiento	Syngenta	fenexamida	ciprodinil + fludioxonil	boscalid + byraclostrobin	tebuconazol + fluopyram	<i>Malaleurca</i> <i>Alternifolia</i>
B11	2,88 ± 0,13bc	1,85 ± 0,10ab	0,97 ± 0,06a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a
B33	2,57 ± 0,13a	1,63 ± 0,08ab	1,15 ± 0,09a	0,97 ± 0,23b	1,15 ± 0,18b	0,00 ± 0,00a
B68	2,47 ± 0,15ab	1,37 ± 0,24a	0,95 ± 0,1 a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00c	0,00 ± 0,00a
B69	3,23 ± 0,15c	1,43 ± 0,24 a	0,70 ± 0,05a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00c	0,00 ± 0,00a
B55	2,23 ± 0,03	2,07 ± 0,15ab	1,10 ± 0,05a	1,28 ± 0,26bcd	1,15 ± 0,23d	0,00 ± 0,00a
B72	2,50 ± 0,18ab	1,90 ± 0,18ab	1,05 ± 0,13a	0,82 ± 0,33bc	0,60 ± 0,09e	0,00 ± 0,00a
B49	2,45 ± 0,35a	1,80 ± 0,18ab	1,67 ± 0,2 a	1,83 ± 0,21bcd	1,28 ± 0,19e	0,53 ± 0,12b
B67	2,65 ± 0,13ab	1,92 ± 0,16ab	2,03 ± 0,25a	1,45 ± 0,05d	1,75 ± 0,28f	0,27 ± 0,12b
B63	2,27 ± 0,15a	1,72 ± 0,03ab	0,42 ± 0,10b	1,35 ± 0,09cd	1,13 ± 0,03g	0,30 ± 0,00a
B25	2,33 ± 0,15a	1,85 ± 0,23ab	0,90 ± 0,22c	0,88 ± 0,24bcd	0,83 ± 0,06g	0,00 ± 0,00a
B66	2,23 ± 0,14a	1,98 ± 0,79ab	1,43 ± 0,23d	0,87 ± 0,46bc	0,73 ± 0,13g	0,00 ± 0,00a
B32	2,55 ± 0,09ab	2,37 ± 0,25b	1,35 ± 0,09d	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00h	0,00 ± 0,00a
B115	2,22 ± 0,39a	1,52 ± 0,15ab	1,22 ± 0,26d	0,77 ± 0,12b	0,58 ± 0,08i	0,00 ± 0,00a
B71	2,32 ± 0,16a	1,60 ± 0,20ab	0,85 ± 0,09d	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00j	0,00 ± 0,00a

\*Todos los datos son mostrados como la media de tres replicas ± desvió estándar Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

