

Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay

Gepp Vivienne¹, Vero Silvana², Cassanello María Emilia³, Romero Graciela¹, Silvera Elisa¹, González Pablo¹, Rebellato Julia¹, Ferreira Yohana², Bentancur Oscar⁴

¹Unidad de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía (Universidad de la República) Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: vgepp@fagro.edu.uy

²Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química (Universidad de la República) Av. Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay.

³Unidad de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, E. E. Facultad de Agronomía en Salto (Universidad de la República) Ruta 31, km 21,5, Salto.

⁴Departamento de Biometría, Estadística y Computación, Estación Experimental Mario A. Cassinoni, Ruta 3, km. 363. Facultad de Agronomía (Universidad de la República) Paysandú.

Recibido: 11/3/10 Aceptado: 18/8/11

Resumen

Botrytis cinerea provoca pérdidas importantes en numerosos cultivos y posee alta capacidad para hacerse resistente a fungicidas. Para conocer la situación en Uruguay se evaluó la sensibilidad a fungicidas de 169 aislamientos provenientes de seis cultivos monospóricos provenientes de arándano, tomate, frutilla, viña, rosál y eucalipto de diferentes zonas. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de Carbendazim (Carbendazim, 50,0% i.a.), Iprodione (Rovral, 50,0% i.a., BAYER), Pyrimetanil (Mythos, 30,0% i.a., BAYER) y Pyraclostrobin + Boscalid (Bellis, 12,80% y 25,20% i.a., respectivamente, BASF). Se evaluó crecimiento a las 48 horas en placas con agar papa dextrosa (gelatina-glucosa para Pyrimetanil) con diferentes concentraciones de fungicida. Se encontraron poblaciones con diferente comportamiento. La resistencia a Carbendazim (CIM > 128 mg/l) predominó en todos los cultivos muestreados, menos en arándano. Para Iprodione las CIM se distribuyeron por todos los valores desde <1 a > 16 mg/l y para pirimetanil 30% presentaron CIM ≥ 8 mg/l. La mayoría de los aislamientos presentaron CIM ≤ 4 mg/l de Boscalid + 1 mg/l de Pyraclostrobin, pero 7% presentaron CIM > 32 mg/l + > 16 mg/l. El efecto hospedero fue altamente significativo sobre la sensibilidad a los fungicidas. Los aislamientos provenientes de arándano y eucalipto fueron los más sensibles, salvo cuando los de eucalipto fueron testeados con Carbendazim. Los aislamientos de tomate y rosa fueron los más resistentes, y los de frutilla intermedios.

Palabras clave: anilino pirimidinas, dicarboximidias, bencimidazoles, carboxamidias, moho gris

Summary

Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* in Uruguay

Botrytis cinerea causes important losses in various crops and can easily acquire resistance to fungicides. In order to evaluate resistance in Uruguay, the fungicide sensitivity of 169 monosporic isolates from blueberry, tomato, strawberry, vine, rose and eucalyptus from different regions, was assessed. The minimum inhibitory concentration (MIC) of Carbendazim (Carbendazim, 50,0% i.a.), Iprodione (Rovral, 50,0% i.a., BAYER), Pyrimetanil (Mythos, 30,0% i.a., BAYER) and Pyraclostrobin + Boscalid (Bellis, 12,80% y 25,20% i.a., respectively, BASF) was determined. Growth after 48 hours was evaluated on potato dextrose agar (gelatin glucose agar for pirimetanil) with different concentrations of fungicide. Populations differing in behavior were found. Resistance to Cabendazim (MIC > 128 mg/l) predominated in all crops samples, except in blueberries. Iprodione MICs ranged from <1 to > 16 mg/l, and 30% of the isolates' MIC was > 8 mg/l. The majority of isolates' MIC was < 4 mg/l.

of Boscalid + 1 mg/l of Pyraclostrobin, but for 7% MIC was > 32 mg/l + > 16 mg/l. The host crop had a very significant effect on the sensitivity to fungicides. Isolates from blueberries and eucalyptus were the most sensitive, except when the latter were tested with Carbendazim. Isolates from tomato and rose were the most resistant, and those from strawberry were intermediate.

Key words: anilinopirimidines, dicarboximides, benzimidazoles, carboxamides, grey mould

Introducción

Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel, más conocido por su anamorfo *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., es un patógeno polífago que afecta la producción de numerosos cultivos. En el Uruguay provoca pérdidas importantes debido a la pudrición que produce en frutos y otros órganos de cultivos como frutilla, tomate, morrón, viña y arándano, y en plantines de ornamentales y forestales.

El manejo de la enfermedad se basa en una combinación de medidas culturales y el uso de fungicidas, algunos de múltiples sitios de acción y otros más modernos, más efectivos pero de mayor riesgo de resistencia. Entre éstos están los bencimidazoles, dicarboximidas, anilinopirimidinas y carboxamidas. *B. cinerea* es uno de los patógenos considerados de alto riesgo para la aparición de cepas resistentes a fungicidas (Russel, 2004), y en varios países se ha determinado la existencia de cepas resistentes a dicarboximidas (LaMondia y Douglas, 1997; Lennox y Spotts, 2003; Myresiotis *et al.*, 2007; Yourman y Jeffers, 1999), anilinopirimidinas (Bardas *et al.*, 2008; Baroffio *et al.*, 2003; Forster y Staub, 1996; Latorre *et al.*, 2002; Moyano *et al.*, 2004), carboxamidas y estrobirulinas (Myresiotis *et al.*, 2008). En Uruguay se ha detectado resistencia en otros patógenos como *Penicillium* spp. (Santos *et al.*, 1989; Pianzola *et al.*, 2004) y *Monilinia fructicola* (Leoni, 2004) pero no existía información experimental sobre la resistencia de *B. cinerea* a fungicidas en el Uruguay. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la sensibilidad de aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de arándano, tomate, frutilla, viña, eucalipto y rosál provenientes de diferentes zonas del país a los fungicidas: Carbendazim, Iprodione, Pirimetanil y el fungicida mezcla Boscalid + Pyraclostrobin.

Materiales y métodos

Muestreos

Entre 2006 y 2008 se visitaron más de 50 predios ubicados en diferentes partes del país y se obtuvieron muestras de tejido vegetal de viña, tomate en invernáculo, frutilla, arán-

dano, eucalipto (vivero bajo malla de sombra) y rosál. En cada predio se sacaron entre 1 y 10 muestras (con síntomas o de órganos posiblemente infectados) de diferentes partes del cuadro. Los órganos muestreados fueron: uvas maduras o inmaduras, frutos de frutilla, frutos, tallos y restos florales de tomate, flores de arándano, plantas de eucalipto y pétalos de rosa. Las muestras se colocaron individualmente en bolsas plásticas en el campo y se conservaron en heladera hasta su procesamiento. Se recabó información de los fungicidas aplicados al cultivo muestreado.

Obtención y conservación de aislamientos monospóricos

El aislamiento se realizó en agar malta con 0,02% de sulfato de estreptomina. Se sembraron conidios directamente de muestras que vinieron del campo esporuladas o luego de incubarlas en cámara húmeda. En el caso de uvas inmaduras, se congelaron durante 12 horas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1%, se enjuagaron en agua destilada estéril y se colocaron individualmente en cámaras húmedas hasta lograr la esporulación característica de *Botrytis cinerea* (Ellis, 1971).

Cada aislamiento se sembró en un tubo con medio papa dextrosa agar (PDA) y se incubó durante 15 días hasta lograr la esporulación. Los conidios se desprendieron por agitación con 2 ml NaCl 0,9% + 0,05% de Tween 80. Una suspensión de $10^3 - 10^4$ esporas/ml se sembró mediante estriado en una placa de PDA y se incubó a 25 °C durante 24 o 48 horas para obtener una colonia monospórica por cada aislamiento. Se guardaron discos de micelio en PDA en ependorf con agua destilada estéril a 5 °C para los estudios posteriores.

Ensayos de sensibilidad a fungicidas

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los fungicidas: Carbendazim (Carbendazim, 50,0% i.a.), Iprodione (Rovral, 50,0% i.a., BAYER), Pirimetanil (Mythos, 30,0% i.a., BAYER) y el fungicida mezcla Pyraclostrobin + Boscalid (Bellis, 12,80% y 25,20% i.a., respectivamente, BASF). Se probaron las concentraciones: 4, 16, 32 y

128 mg/l para Carbendazim, 1, 2, 4, 8 y 16 mg/l para Iprodione y 0,5, 1, 2, 4 y 8 mg/l para Pyrimetanil. En el caso del fungicida mezcla las concentraciones utilizadas fueron: 2 + 1, 4 + 2, 8 + 4, 16 + 8 y 32 + 16 mg/l de Boscalid y de Pyraclostrobin, respectivamente. En cada caso diluciones stock de los fungicidas se prepararon en agua destilada estéril a partir de las formulaciones comerciales (Bardas *et al.*, 2009; Lennox y Spotts, 2003; Northover, 1988; Yourman y Jeffers, 1999) de acuerdo a la concentración de principio activo declarada en cada producto.

Los ensayos de sensibilidad se realizaron mediante el método de dilución en placa, descrito por Cabañas *et al.* (2009). Cada aislamiento monospórico se sembró en un vial con 5 ml de PDA y se incubó siete días a 25 °C. Los conidios se desprendieron por agitación con 2 ml NaCl 0,9% + 0,05% de Tween 80. Se ajustó la concentración a 10⁵ esporas/ml por dilución en agua estéril. Para el ensayo se utilizaron placas de Petri de 90 mm con 10 ml medio con la correspondiente concentración de fungicida dispensado el día anterior para evitar la presencia de agua de condensada. El medio utilizado fue PDA, salvo que para pirimetanil se utilizó el medio gelatina-glucosa (GG) preparado según recomendación de Sierotzki y Edel (2006). El fungicida se agregó al medio fundido a 45 °C, en una solución en agua destilada esterilizada, inmediatamente antes de dispensar las placas. En cada placa se sembró 1 µl de la suspensión de esporas en hasta nueve puntos separados entre sí. Se hicieron dos repeticiones de cada aislamiento. Las placas se incubaron 72 h a 25 °C, antes de evaluar macroscópicamente, presencia o ausencia de crecimiento, determinándose la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), o sea, la

mínima concentración del fungicida que causaba 100% de inhibición del crecimiento.

Análisis estadístico

El efecto del huésped del cual procedían los aislamientos sobre la sensibilidad (CIM) a cada fungicida fue estudiada ajustando modelos lineales generalizados asumiendo distribución multinomial ordinal de la variable de respuesta (CIM) mediante el procedimiento GENMOD del paquete estadístico SAS versión 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC, 2005). Para la presentación de los resultados se calculó la sensibilidad media de la población de *B. cinerea* asociada a cada huésped, como la media de las CIM determinadas para los aislamientos correspondientes, dado que la media es consecuencia de la distribución.

Resultados

Se obtuvieron 169 aislamientos monospóricos de los cinco cultivos en los muestreos realizados (Cuadro 1). En la mayoría de los casos, el hongo se obtuvo de órganos visiblemente afectados en el campo, aunque en algunas bayas de uva éste se desarrolló luego de incubarse en cámara húmeda.

Se obtuvo información correspondiente a los fungicidas aplicados en la mayoría de los casos de arándano, tomate, viña y eucalipto, pero en pocos de frutilla y rosa. En arándano se utilizaron dicarboximidas y anilopirimidinas salvo en un predio que sólo aplicó un bencimidazol. En tomate se utilizaron mayor variedad de fungicidas, en general tres a cinco por cultivo, incluyendo hasta tres de los grupos consi-

Cuadro 1. Procedencia de los aislamientos analizados.

Cultivo	Número de aislamientos					Total
	Sur		Norte			
	Canelones y Montevideo	Durazno	Salto	Paysandú	Tacuarembó	
Arándano	23			2		25
Eucalipto		6			12	18
Frutilla	24		12			36
Tomate	19		37			56
Rosal	6					6
Viña	28					28
Total	106			63		169

derados en el ensayo. El porcentaje de aislamientos que provenían de cultivos en los cuales se aplicaron dicarboximidias fue 63%, bencimidazoles 47,4%, anilopirimidinas 35%, Boscalid 8,8% y estrobilurinas 12,3%. En el caso de vid, 100% de los 22 aislamientos de los cuales se conocen los tratamientos recibieron dicarboximidias, 81,2% anilopirimidinas y 9% bencimidazoles. En los viveros de eucalipto se aplicó exclusivamente un fungicida compuesto (anilopirimidinas + fenilpirrol) pero en años anteriores se utilizaban bencimidazoles.

Los valores de CIM para cada fungicida obtenidos para cada aislamiento fueron concordantes en dos la repeticiones.

Sensibilidad a Carbendazim

La mayoría (72,4%) de los aislamientos fueron capaces de crecer aún en presencia de la mayor concentración de Carbendazim ensayada (128 mg/l) mientras que el resto no pudo crecer ni siquiera con la menor dosis (4 mg/l) (Figura 1).

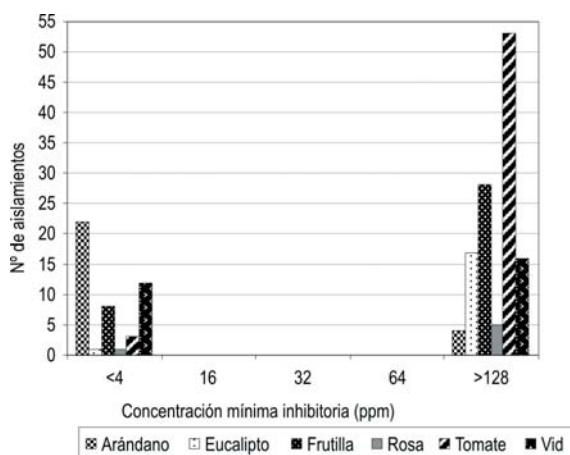


Figura 1. Distribución de valores de concentración inhibitoria mínima a Carbendazim según cultivo del cual proceden.

En la mayoría de los cultivos predominaron los aislamientos con CIM > 128 mg/l (eucalipto y tomate 94%, rosa 83%, frutilla 78%), pero en viña la proporción fue más pareja (57% resistentes : 43% sensibles) mientras que en arándano predominaron las cepas sensibles (85% con CIM < 4 mg/l). Al analizar estadísticamente la distribución de la sensibilidad según huésped, se comprueba la mayor proporción de resistentes en tomate y de sensibles en arándano (Cuadro 2). La distribución de la sensibilidad en tomate no difiere de las de eucalipto y rosa ni éstas de la de frutilla, y la de la vid se encuentra entre la de arándano y la de la frutilla, no difiriendo de éste último.

En arándano sólo se detectaron cuatro cepas resistentes. En el único predio en el que se sabe que se aplicó un benzimidazol se obtuvo un aislamiento sensible a Carbendazim. En viveros de eucalipto 17 (94%) de los 18 aislamientos resultaron ser resistentes a Carbendazim. En frutilla 28 (77,8%) de los 36 aislamientos fueron resistentes al fungicida. En cuanto a la ubicación del cultivo, la relación entre aislamientos resistentes y sensibles fue de cinco a uno en el norte del país y de tres a uno en el sur.

Sensibilidad a Iprodione

Los valores de CIM de Iprodione se distribuyeron en todo el rango de concentraciones analizadas y casi la mitad (45%) de la población resultó ser sensible o levemente resistente (CIM ≤ 2 mg/l) y solo 25% tenía CIM > 16 mg/l (Figura 2).

En eucalipto y en arándano predominaron los aislamientos sensibles con CIM ≤ 2 mg/l (sólo una cepa con CIM = 8 mg/l en cada cultivo y ninguno >16 mg/l). En la vid, también predominaron los aislamientos más sensibles, con 53,6% con CIM ≤ 2 mg/l, pero 21,5% de aislamientos presentaron CIM ≥ 8 mg/l. En frutilla los valores de CIM se distribuyeron por todo el rango, predominando los aisla-

Cuadro 2. Comparación de las distribuciones de valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aislamientos a Carbendazim según cultivo del cual proceden.

Huésped	Nº observaciones	CIM media	Contraste (P < 0,05)
Tomate	56	121,36	A
Eucalipto	18	121,11	AB
Rosa	6	107,33	AB
Frutilla	36	100,44	BC
Vid	28	74,86	C
Arándano	25	23,84	D

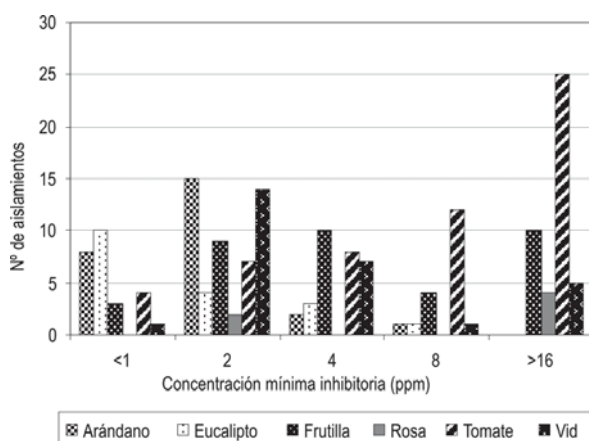


Figura 2. Distribución de valores de concentración inhibitoria mínima a Iprodione según cultivo del cual proceden.

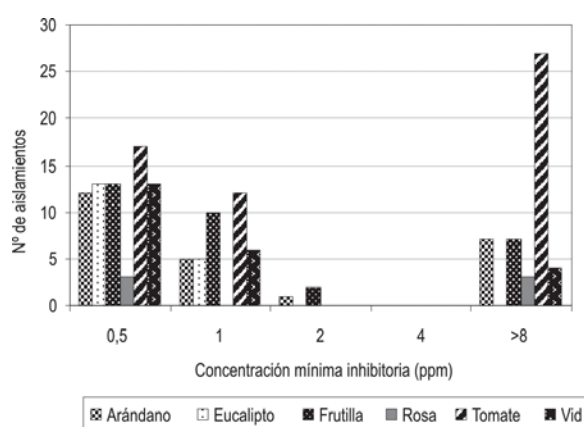


Figura 3. Distribución de valores de concentración inhibitoria mínima a Pirimetanil según cultivo del cual proceden.

Cuadro 3. Comparación de las distribuciones de valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aislamientos a Iprodione según cultivo del cual proceden.

Huésped	Nº observaciones	CIM media	Contraste (P < 0,05)
Rosa	6	11,33	A
Tomate	56	9,75	A
Frutilla	36	7,03	AB
Vid	28	5,18	B
Eucalipto	18	2,11	C
Arándano	25	2,08	C

mientos con CIM ≥ 2 mg/l. En tomate casi la mitad (44,6%) de los aislamientos presentó una CIM ≥ 16 mg/l.

El análisis estadístico de la distribución de sensibilidad según huésped permitió establecer diferencias de sensibilidad entre las poblaciones asociadas a los diferentes cultivos y ordenarlos de los más sensibles a los más resistentes: primero eucalipto y arándano, luego vid, el cual se diferenció significativamente de ellos pero no de frutilla, y éste a su vez, no se diferenció de tomate y rosa (Cuadro 3).

Sensibilidad a Pirimetanil

Los valores de concentración mínima inhibitoria de pirimetanil se distribuyeron de manera bimodal, con la mayoría 109 (68,1%) aislamientos con CIM ≤ 1 mg/l y 48 (30%) con CIM > 8 mg/l. En tomate casi la mitad de los aislamientos

tenían una CIM > 8 mg/l, mientras que en el extremo opuesto, en ninguno de los aislamientos de eucalipto superó 1 mg/l (Figura 3).

En el contraste de distribuciones se pudo separar tres grupos según el huésped. Los aislamientos de mayor resistencia media fueron los obtenidos de rosa, tomate, arándano y frutilla, sin diferencias significativas entre ellos (Cuadro 4). Los de vid presentaron una distribución de valores intermedios que no diferían significativamente de los de arándano y de frutilla. Por último se diferenciaron los aislamientos de viveros de eucalipto, todos los cuales evidenciaron gran sensibilidad (CIM ≤ 1 mg/l).

En ninguno de los predios con información de los fungicidas aplicados se había aplicado anilino pirimidinas durante el cultivo, con excepción de la vid, el cultivo que le sigue al eucalipto en cuanto a menor proporción de resistentes.

Cuadro 4. Comparación de las distribuciones de valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aislamientos a Pirimetanil según cultivo del cual proceden.

Huésped	Nº observaciones	CIM media	Contraste (P < 0,05)
Rosa	6	4,25	A
Tomate	56	4,18	A
Arándano	24	2,77	AB
Frutilla	32	2,30	AB
Vid	23	1,87	B
Eucalipto	18	0,50	C

Sensibilidad a Boscalid + Pyraclostrobin

La mayoría de los aislamientos presentaron CIM < 2 mg/l de Boscalid + 1 mg/l de Pyraclostrobin, pero el 7% mostró resistencia, con CIM > 32 mg/l + > 16 mg/l de Boscalid y Pyraclostrobin, respectivamente. Estos correspondieron a cinco aislamientos de un mismo viñedo, cuatro de rosa de un predio de floricultores, y en la zona norte: dos de frutilla y uno de tomate (Figura 4).

El contraste de las distribuciones según cultivo permitió diferenciar tres grupos: rosa y vid con más resistencia, frutilla intermedio y tomate, arándano y eucalipto con menos resistencia (Cuadro 5).

Considerando la aplicación previa del fungicida, sólo se obtuvieron cuatro aislamientos de cultivos en los cuales se sabe que se usó este tipo de producto y ninguno de ellos presentó resistencia.

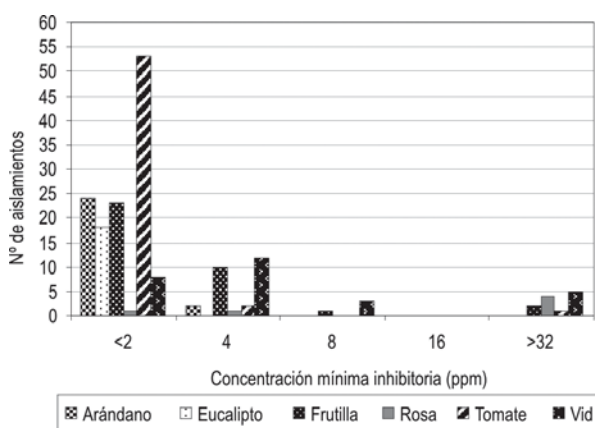


Figura 4. Distribución de valores de concentración inhibitoria mínima a Boscalid + Pyraclostrobin según cultivo del cual proceden.

Cuadro 5. Comparación de las distribuciones de valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aislamientos a Boscalid + Pyraclostrobin según cultivo del cual proceden.

Huésped	Nº observaciones	CIM media	Contraste (P < 0,05)
Rosa	6	11,17	A
Vid	28	4,43	A
Frutilla	36	2,19	B
Tomate	56	1,30	C
Arándano	25	1,08	C
Eucalipto	18	1,00	C

Resistencia a más de un fungicida

Se detectaron aislamientos con resistencia a varios fungicidas. Entre ellos se destacan dos con los máximos valores evaluados de CIM para los cuatro fungicidas, uno proveniente de frutilla y otro de rosa. Cuarenta y cuatro presentaron los mayores valores de CIM para Carbendazim e Iprodione, dieciocho para Carbendazim, Iprodione y Pyrimetanil y ocho para Carbendazim, Iprodione y el fungicida Boscalid + Pyraclostrobin. Estos aislamientos de mayor resistencia provenían de tomate, frutilla, vid y rosa. En el otro extremo se encontraron 34 aislamientos con $CIM \leq 4$ para los cuatro fungicidas, provenientes de los cinco huéspedes muestreados.

Discusión

El método de determinación de sensibilidad a fungicidas permitió detectar diferencias de sensibilidad entre los aislamientos obtenidos. Es un método sencillo, que requiere poco material y que permite por lo tanto, el análisis de muchas muestras a la vez.

La determinación de sensibilidad a Boscalid y Pyraclostrobin se realizó en forma conjunta. Se trata de dos fungicidas químicamente diferentes, con diferentes sitios de acción. El Boscalid pertenece al grupo de los inhibidores de la succinato deshidrogenasa de la cadena respiratoria fúngica. El Pyraclostrobin, por su parte, es una estrobilurina del grupo de los denominados QoI (Quinone outside inhibitors) que inhiben la cadena respiratoria actuando sobre el complejo III. Los hongos como *B. cinerea* podrían utilizar una vía oxidativa alternativa, superando la toxicidad de estrobilurinas, para evitar este proceso se incluye SHAM (salicylhydroxamic acid) en el medio de cultivo (Wood y Holomon, 2003). Sin embargo, actualmente FRAC (Stammler, 2009) no lo recomienda y en este estudio no se utilizó tal compuesto.

Los datos aportados por este estudio, permitieron determinar diferencias en sensibilidad en aislamientos de *B. cinerea* a fungicidas en varios cultivos en Uruguay. La monitorización futura, utilizando la misma metodología permitirá establecer diferentes perfiles de sensibilidad en cultivos y estudiar la evolución de dichos perfiles en el tiempo.

La mayoría de los aislamientos analizados en el presente trabajo resultaron ser altamente resistentes al Carbendazim, lo cual era esperable debido al uso repetido de los bencimidazoles y las características de los cambios genéticos que confieren resistencia frente a ellos. Los bencimidazoles se utilizan a nivel mundial desde comienzos de la

década de 1960 y en 1971 se reportaron cepas de campo de *B. cinerea* resistentes (Bollen y Scholten, 1971). En el Uruguay se han utilizado desde la década de 1970, habiendo sido aplicados repetidamente cada año en varios cultivos. Santos *et al.* (1989) y Pianzola *et al.* (2004) determinaron resistencia a bencimidazoles en 100 y 75%, respectivamente, de las cepas de *Penicillium* sp. asociados a la cosecha y procesamiento de manzanas. Actualmente su uso ha disminuido, justamente por la falta de efectividad debido a la selección de cepas resistentes. De la información que se pudo obtener sobre los fungicidas aplicados a los cultivos muestreados en el ensayo se desprende que en 2007 los bencimidazoles fueron utilizados principalmente en el norte del país en la producción de tomate.

La persistencia de los individuos resistentes aún cuando se dejan de usar los bencimidazoles (Yourman *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2010) explica el hecho de no poder establecer ninguna relación entre el uso de bencimidazoles en el cultivo en la temporada en que se realizó el estudio y la proporción de cepas resistentes. De hecho, 57% de los aislamientos resistentes provenían de cultivos sin aplicación de este tipo de fungicida. LaMondia y Douglas (1997) tampoco pudieron correlacionar la resistencia de *B. cinerea* con los fungicidas aplicados en los invernáculos de plantas ornamentales muestreados. Sin embargo, al analizar los aislamientos provenientes de viña se logró encontrar una correspondencia entre resistencia o sensibilidad de los aislamientos y el predio del cual se obtuvieron. Esto puede ser un indicio de la relación entre grados de sensibilidad y manejo de este cultivo perenne y de la poca dispersión del hongo entre predios, tal como reportan Lennox y Spotts (2003).

La distribución bimodal de los aislamientos entre muy sensibles y altamente resistentes encontrado en el presente trabajo coincide con lo reportado por otros autores (Lennox y Spotts, 2003; Pappas, 1997; Yourman y Jeffers, 1999), y se explica porque algunas mutaciones en una sola base en el sitio de acción son capaces de conferir insensibilidad al fungicida (Lennox y Spotts, 2003). La causa más frecuente de resistencia en el campo son mutaciones naturales en los codones 198 o 200 del gen que codifica para la betatubulina (Leroux *et al.*, 2002; Ma y Michailides, 2005).

En el caso de las dicarboximidas, a pesar de que se han utilizado intensamente en varios cultivos en el país durante cerca de 30 años, 65% de la población de *B. cinerea* resultó ser sensible a 2 mg/l de Iprodione. Una situación similar fue reportada por Santos *et al.* (1989) y Pianzola *et al.* (2004), quienes detectaron 36 y 25%, respectivamente, de cepas de *Penicillium* sp. con resistencia a Iprodione, aso-

ciadas a la cosecha y procesamiento de manzanas en el Uruguay. A nivel mundial este grupo de fungicidas se utiliza desde de la década de 1970 y la resistencia en cepas aisladas del campo se conoce desde 1979 (Davis y Dennis, 1979 citados por Frac, 2010; Holtz, 1979 citados por FRAC, 2010). En Ontario se detectó resistencia en 1983, sólo cuatro años después de las primeras aplicaciones de dicarboximidias (Northover, 1988). Según Stehmann y De Waard (1996) más de la mitad de la 121 aislamientos de *B. cinerea* de Europa e Israel resultaron ser resistentes a vinclozolin.

El hecho de que la mayoría de la población evaluada en este trabajo sea sensible o muy poco resistente puede deberse a que, a pesar de la demostrada capacidad de *B. cinerea* de perder sensibilidad a los dicarboximidias en pocos años, la resistencia a dicarboximidias es una característica inestable (Northover, 1988; Yourman *et al.*, 2001). Northover (1988) determinó que las cepas moderadamente resistentes a Iprodione que se encuentran a campo poseen menor capacidad competitiva debido a una disminución en su tasa de crecimiento. Por lo tanto desaparecerían por competencia con las cepas salvajes en ausencia de la presión de selección ejercida por la presencia del fungicida.

El tipo de distribución continua de los valores de CIM de las dicarboximidias observado en el presente trabajo se corresponde con lo determinado por otros investigadores (Stehmann y De Waard, 1996; Lennox y Spotts, 2003), aunque Myresiotis *et al.* (2007) obtuvieron una distribución bimodal de la sensibilidad de los aislamientos. La distribución continua puede estar relacionada con la presencia de más de un mecanismo de resistencia y de hecho Ma y Michailides (2005) mencionan dos genes que han sido asociados a la resistencia a dicarboximidias en *B. cinerea*.

El pirimetanil es una anilopirimidina cuyo sitio de acción es en la biosíntesis de metionina. Fungicidas de 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), de diferente sitio de acción. Desde fines de la misma década se está utilizando el Pirimetanil formulado sin otro principio activo. Dado que las dos anilopirimidinas poseen el mismo sitio de acción, las cepas resistentes a una lo serán también a la otra y al aplicar una, se estarán seleccionando los individuos resistentes a cualquier anilopirimidina.

Un tercio de la población evaluada en el presente trabajo presentó una CIM > 8 mg/l. Myresiotis *et al.* (2007) reportaron 57 y 49% de cepas resistentes a cyprodinil y pirimetanil, respectivamente, luego de siete años de uso en la isla

de Creta y Latorre *et al.* (2002), 38% de resistencia cyprodinil en viñedos con cuatro aplicaciones anuales durante dos ciclos en Chile. Aunque la metodología de evaluación fue diferente en los tres trabajos, los resultados evidencian la capacidad de las cepas resistentes de *B. cinerea* de prosperar y aumentar su frecuencia frente a la presión de selección ejercida por la aplicación repetida de anilopirimidinas. Además hay que tener presente que se ha reportado entre 6 y 11% de aislamientos de *B. cinerea* con menor sensibilidad a pirimetanil o cyprodinil en poblaciones no expuestas a anilopirimidinas (Forster y Staub, 1996; Latorre *et al.*, 2002; Moyano *et al.*, 2004). La resistencia a las anilopirimidinas se considera una característica estable debido a que los aislamientos con resistencia parecen poseer una habilidad competitiva similar a los de los sensibles (Bardas *et al.*, 2008; Moyano *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, Baroffio *et al.* (2003) encontraron que las cepas resistentes sobrevivían en menor medida el invierno en viñedos suizos. Por lo tanto se resalta la importancia de evitar las aplicaciones repetidas de anilopirimidinas para evitar la selección de cepas resistentes.

Moyano *et al.* (2004) y Latorre *et al.* (2002) encontraron una correspondencia entre la resistencia determinada *in vitro* con la ausencia de control con anilopirimidinas *in vivo*. Forster y Staub (1996), en cambio, afirman que la resistencia detectada en ensayos *in vitro* no pudo ser confirmada *in vivo*. En un trabajo futuro se deberá comparar el control logrado en plantas tratadas con 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.

La distribución de los aislamientos según su sensibilidad a pirimetanil en dos grupos es similar a lo reportado por Myresiotis *et al.* (2007) para los anilopirimidinas ciprodinil y pirimetanil en la isla de Creta. Este comportamiento sería característico de una resistencia determinada por un gen.

El Boscalid se registró en Uruguay en 2007, mientras que las strobilurinas, grupo al que pertenece Pyraclostrobin, se usan desde fines de la década de 1990. El Boscalid pertenece al grupo de los inhibidores de la succinato deshidrogenasa de la cadena respiratoria fúngica, los que se conocen actualmente como fungicidas SDHI. La primera generación de estos fungicidas fue desarrollada hace más de 40 años e incluyó principios activos como el carboxin, pero debido a su uso limitado a pocos patosistemas, los casos de resistencia a campo fueron escasos. En cuanto a Boscalid, cepas resistentes provenientes de vid y frutilla

fueron detectados en 2006 y 2007 respectivamente, en países de Europa (FRAC, 2009). La resistencia a las estrobilurinas, principal grupo de los fungicidas QoI, ha sido determinada en varios hongos fitopatógenos de importancia en diferentes partes del mundo. La resistencia en *B. cinerea* se reportó en 2008 en cultivos de frutilla y en citrus (Ishii, 2008).

Los aislamientos del presente trabajo con resistencia simultánea a ambos ingredientes activos fueron obtenidos en 2007 y provienen de cinco predios diferentes, tres del norte del país (dos cepas de frutilla y uno de tomate) y dos del sur: un viñedo y un invernáculo de flores.

Dos artículos publicados en 2010 reportaron la detección de resistencia simultánea a Boscalid y Pyraclostrobin en aislamientos de *B. cinerea* provenientes de kiwi en Grecia en 2008-2009 (Bardas *et al.*, 2009) y de manzana en Estados Unidos de América en 2008 (Kim y Xiao, 2010). Los aislamientos en cuestión fueron obtenidos de frutos producidos en 2008 en cultivos tratados con el fungicida cuya formulación contenía ambos principios activos. La distribución de frecuencias de valores de sensibilidad tanto a Boscalid como a Pyraclostrobin fue bimodal (Bardas *et al.*, 2009; Kim y Xiao, 2010).

El fenotipo con alta resistencia a varios fungicidas más común encontrado en este trabajo fue el que presentó alta CIM para Carbendazim y para Iprodione, probablemente por la alta persistencia de la resistencia al primero y por el uso continuado en la actualidad del segundo.

Considerando los diferentes cultivos, el arándano fue el que presentó menor proporción de resistencia a fungicidas en general. Este es un cultivo nuevo para el país desarrollado recién en los años 2000, lo cual podría explicar la baja proporción de individuos resistentes a la mayoría de los fungicidas evaluados. Para mantener esta situación, se deberá limitar el uso de fungicidas de alto riesgo, alternándolos con otros de menor riesgo. No se encontraron evidencias de que se esté procediendo de esta manera en los predios muestreados en el presente estudio. Dado que la mayoría de los aislamientos se obtuvieron de cultivos ubicados en predios frutícolas donde se han utilizado fungicidas dicarboximidas y bencimidazoles durante años, se podría esperar que las esporas que pudieran migrar hacia el arándano presentarían una proporción de aislamientos resistentes al menos a los bencimidazoles. Los resultados del presente trabajo estarían sugiriendo que existe poca migración de cepas de un cultivo a otro, tal como afirman Lennox y Spotts (2003).

En eucalipto se encontró muy poca resistencia a los fungicidas evaluados con excepción del Carbendazim. El aumento de la forestación en los últimos 20 años llevado a cabo por grandes empresas ha llevado a la producción masiva de plantines en invernáculos de gran tamaño, donde las condiciones son óptimas para *B. cinerea*. El uso repetido de bencimidazoles en años anteriores en estas condiciones puede explicar el hecho de que 94% de los aislamientos obtenidos de plantines de eucalipto resultaron ser resistentes a Carbendazim. Actualmente, en general no se están usando bencimidazoles, lo cual parece una decisión racional en esta situación. La información aportada en el muestreo indica que durante el invierno de 2007 se aplicó solamente un fungicida, el cual contiene una anilopirimidina y un fenilpirrol. Aunque en el muestreo realizado no se encontraron aislamientos resistentes a anilopirimidinas en los invernáculos, esto puede deberse a que la proporción aún era demasiado baja para detectarlos, pero es esperable que aumenten rápidamente su frecuencia si se utiliza repetidamente fungicidas de este grupo.

La mayoría de los aislamientos procedentes de la vid eran de cultivos manejados según el Programa de Producción Integrada de Uva, el cual limita el uso de los fungicidas de mayor riesgo de resistencia como los bencimidazoles a una aplicación al año. Esto podría explicar el hecho de que la vid fue uno de los cultivos con menor proporción de aislamientos resistentes a Carbendazim. En relación con los otros fungicidas este cultivo estuvo en un lugar intermedio, excepto en el análisis de Boscalid + Pyraclostrobin.

El tomate estuvo entre los cultivos con más resistencia a todos los fungicidas excepto Boscalid + Pyraclostrobin, posiblemente porque este producto se ha usado poco en el cultivo hasta el momento. La resistencia a múltiples principios activos refleja la utilización de varios fungicidas de diferentes grupos durante el ciclo del cultivo.

La frutilla en general estuvo en una ubicación intermedia de nivel de resistencia para todos los fungicidas.

Aunque el muestreo de rosa fue muy limitado, se encontró un alto nivel de resistencia a todos los fungicidas evaluados, lo que estaría indicando un uso muy intenso de fungicidas en el cultivo.

Conclusiones

Se determinó la existencia de resistencia en todos los cultivos y zonas evaluados y a todos los fungicidas evaluados. Se detectó el uso de prácticas como la utilización de un

único fungicida con modo de acción de sitio único (lo cual implica alto riesgo de generación de resistencia) en invernáculos de eucalipto. Es recomendable la revisión de las prácticas de uso de fungicidas y el establecimiento de un programa de manejo de resistencia. Como perspectivas futuras de este trabajo se debería continuar evaluando la sensibilidad a los diferentes fungicidas con la misma metodología y asociarlo con el manejo en cada punto de muestreo, de manera de conocer la evolución de los perfiles de sensibilidad y poder manejar mejor la enfermedad.

Agradecimientos

Al Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT) que financió e hizo posible la investigación. A los numerosos productores que nos permitieron recoger muestras de sus cultivos. A las empresas Bayer S.A. y BASF Uruguay S.A. que proporcionaron los fungicidas para los ensayos de sensibilidad.

Bibliografía

- Bardas GA, Veloukas T, Koutitab O, Karaoglanidis GS. 2009. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science*, 66: 967 - 973.
- Bardas GA, Myresiotis CK, Karaoglanidis GS. 2008. Stability and fitness of anilinoimidazole-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 98: 443 - 450.
- Baroffio CA, Siegfried W, Hilber UW. 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botrytis cinerea* to anilinoimidazole, phenylpyrrole, and hydroxylanilide fungicides in Switzerland. *Plant Disease*, 87: 662 - 666.
- Bollen G, Scholten G. 1971. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 77: 83 - 90.
- Cabañas R, Abarca ML, Bragulat MR, Cabañas FJ. 2009. In vitro activity of imazalil against *Penicillium expansum*: Comparison of the CLSI M38-A broth microdilution method with traditional techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1): 26 - 29.
- Davis RP, Dennis C. 1979. Use of dicarboximide fungicides on strawberries and potential problems of resistance in *Botrytis cinerea*. Citado por: FRAC. List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents [En línea]. 66p. Consultado 11 febrero 2011. Disponible en: http://www.frac.info/frac/publication/anhang/List_of_resistant_plant_pathogens_Jan%202010.pdf, 2010.
- Ellis MB. 1971. Dematiaceae hyphomycetes. Surrey: CAB. 179p.
- Forster B, Staub T. 1996. Basis for use strategies of anilinoimidazole and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection*, 15: 529 - 537.
- FRAC. 2009. Succinate Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) Working Group: Monitoring Results 2008 and Use Recommendations 2009 [En línea]. Consultado 11 febrero 2011. Disponible en: http://www.frac.info/frac/work/090514%20SDHI%20website%20minutes_RG.pdf.
- Holz B. 1979. Über eine resistenzerscheinung von *Botrytis cinerea* an Reben gegen die neuen Kontaktbotrytizide im Gebiet der Mittelmose. Citado por: FRAC. List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents [En línea]. 66p. Consultado 11 febrero 2011. Disponible en: http://www.frac.info/frac/publication/anhang/List_of_resistant_plant_pathogens_Jan%202010.pdf, 2010.
- Ishii H. 2008. Fungicide research in Japan, an overview [En línea]. En: Dehne H-W, Gisi U, Kuck K-h, Russell P E, Lyr H. [Eds.]. International Reinhardtbrunn Symposium; 15^o; 2007; Friedrichroda. Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV. Braunschweig: Deutsche Phytotherapeutische Gesellschaft, pp.11 - 17. Consultado 27 setiembre 2011. Disponible en: <http://dpg.phytotherapeutische.org/fileadmin/download/Reinhardtbrunn2008.pdf>
- Kim Y, Xiao C. 2010. Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in populations of *Botrytis cinerea* in stored apples in Washington State. *Plant Disease*, 94: 604 - 612.
- LaMondia JA, Douglas SM. 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 81: 729 - 732.
- Latorre BA, Spadaro I, Rioja ME. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinoimidazole fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*, 21: 957 - 961.
- Lennox CL, Spotts RA. 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 87: 645 - 649.
- Leoni C. 2004. Manejo integrado de enfermedades en duraznero. En: Seminario de actualización técnica en el cultivo del duraznero. Montevideo: INIA. (Actividades de Difusión; 381). pp. 19 - 26.
- Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Lanen C, Bach J, Gredt M, Chapeland F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 28: 876 - 888.
- Ma Z, Michailides TJ. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24: 853 - 863.
- Moyano C, Gómez V, Melgarejo P. 2004. Resistance to Pirimethanil and other Fungicides in *Botrytis cinerea* Populations Collected on Vegetable Crops in Spain. *Journal of Phytopathology*, 152: 484 - 490.
- Myresiotis CK, Bardas GA, Karaoglanidis GS. 2008. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to Pyraclostrobin and Boscalid and control of anilinoimidazole and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease*, 92: 1427 - 1431.
- Myresiotis CK, Karaoglanidis GS, Tzavella-Klonari K. 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinoimidazole, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 91: 407 - 413.
- Northover J. 1988. Persistence of dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* in Ontario vineyards. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 10: 123 - 132.
- Pappas AC. 1997. Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection*, 16: 257 - 263.
- Pianzola M, Moscatelli M, Vero S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Disease*, 88(1): 23 - 28.
- Russel P. 2004. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management [En línea]. Bruselas: Crop Life International. 56p. (FRAC Monograph; 3). Consultado 13 agosto 2009. Disponible en: <http://www.frac.info/frac/publication/anhang/monograph3.pdf>.
- Santos M de los, Martínez A, Rossini M. 1989. Situación de la resistencia de *Penicillium* fungicidas utilizados en post-cosecha de manzana. [Tesis de grado] Montevideo: Facultad de Agronomía. 123p.
- Sierotzki H, Edel D. 2006. *Botrytis cinerea* [En línea]. Consultado 5 febrero 2009. Disponible en: http://www.frac.info/frac/Monitoring_Methods/anhang/BOTRCL_monitoring_method_Syngenta_2006_V1.pdf.

- Stammler G. 2009. *Botrytis cinerea* [En línea]. Consultado 15 octubre 2009. Disponible en: http://www.frac.info/frac/Monitoring_Methods/anhang/BOTRCI_microtiter_monitoring_method_BASF_2009_V2.pdf.
- Stehmann C, De Waard M. 1996. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* to triazoles, benomyl and vinclozolin. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 171 - 180.
- Wood PM, Holomon DW. 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of Complex III. *Pest Management Science*, 59: 499 - 511.
- Yourman LF, Jeffers SN, Dean RA. 2001. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology*, 91: 307 - 315.
- Yourman LF, Jeffers SN. 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 83: 569 - 575.
- Zhang C, Hu J, Wei F, Zhu G. 2009. Evolution of resistance to different classes of fungicides in *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables in eastern China. *Phytoparasitica*, 37: 351 - 359.
- Zhao H, Kim YK, Huang L, Xiao CL. 2010. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxinil and pirimetanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biology and Technology*, 56: 12 - 18.