

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMIA**

**Determinación del grado de resistencia de aislamientos de *Botrytis cinerea*  
Pers. ex Fr. obtenidos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. y  
*Vaccinium ashei* Reade.) a los fungicidas iprodiona, benomilo y captan.**

Tesis presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de  
Licenciado en Agronomía.

**Mónica Alejandra Zamorano Neumann**

VALDIVIA - CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE:

Luigi Ciampi P.

Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

PROFESORES INFORMANTES:

Roberto Carrillo Ll.

Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

Laura Böhm S.

Ing. Agr.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer de todo corazón a Luigi Ciampi como profesor patrocinante, Roberto Carrillo y la señora Laura Böhm como profesores informantes, cuyos aportes y correcciones dieron fruto al término de este trabajo.

Me gustaría extender estos agradecimientos a todas las personas que trabajan o han pasado por el Laboratorio de Fitopatología, en especial a Ingrid Castro y Judith Carrasco, a los tesisistas Carola Villalobos y Jorge Pérez, don Ramón y Víctor. Con especial cariño a la señorita Hortensia y Sylvia Barrera, cuyos aportes fueron fundamentales para el desarrollo de esta labor.

Por último quisiera agradecer a mi marido Marcelo quien siempre me ha entregado su apoyo, a mis primos Loreto y Christian, a mis abuelitos, padrinos, tíos y a mis amigos Claudio Soto, Paula Vega, Lorena Ibáñez, Nora Lagos y Marcelo Gebauer.

## **Dedicatoria**

Con amor a mis padres, Juan y Rosario;  
mi hermano Daniel y a mi Marcelo.

**INDICE DE MATERIAS**

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1	Desarrollo de los pesticidas en la agricultura moderna	4
2.2	Las nuevas familias de productos químicos para combatir los agentes fitopatógenos	8
2.3	Situación de poblaciones resistentes a fungicidas y bactericidas de hongos fitopatógenos en Chile	12
2.4	Procedimientos para la detección de resistencia a fungicidas	18
2.5	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fr	21
2.5.1	Aspectos generales	21
2.5.2	Clasificación taxonómica	22
2.5.3	Condiciones ambientales para su desarrollo	22
2.6	<i>Vaccinium spp.</i>	23
2.6.1	Aspectos generales	23
2.6.2	Cultivo del arándano en Chile	24
2.6.3	Clasificación taxonómica	24
2.6.4	Descripción botánica	25
2.6.5	Cultivares	25
3	MATERIAL Y METODO	27
3.1	Material	27
3.1.1	Ubicación	27

Capítulo		Página
3.1.2	Material biológico	27
3.1.3	Origen de los aislamientos	27
3.1.4	Equipos y Material de laboratorio	28
3.1.5	Productos químicos	29
3.1.6	Medio de cultivo	29
3.2	Método	29
3.2.1	Selección de los aislamientos	29
3.2.2	Identificación del hongo y conservación de los aislamientos	30
3.2.3	Evaluación de resistencia	30
3.2.4	Preparación y siembra	32
3.2.5	Diseño experimental	33
3.2.6	Análisis estadístico	34
4	PRESENTACION DE RESULTADOS	35
4.1	Iprodiona.	35
4.1.1	Crecimiento de <i>B. cinerea</i> sobre distintas concentraciones del fungicida iprodiona en cada uno de los tres días de incubación	35
4.1.2	Grado de resistencia o sensibilidad de los aislamientos frente al fungicida iprodiona.	44
4.1.2.1	Valores ED <sub>50</sub>	44
4.1.2.2	Dosis crítica e inhibición micelial	45
4.2	Benomilo	45
4.2.1	Crecimiento de <i>B. cinerea</i> sobre distintas concentraciones del fungicida benomilo en cada uno de los tres días de incubación.	45
4.2.2	Grado de resistencia o sensibilidad de los aislamientos	

Capítulo		Página
	frente al fungicida benomilo.	50
4.2.2.1	Valores ED <sub>50</sub>	53
4.2.2.2	Dosis crítica	53
4.3	Captan	54
4.3.1	Crecimiento de <i>B. cinerea</i> sobre distintas concentraciones del fungicida captan en cada uno de los tres días de incubación.	54
4.3.2	Grado de resistencia o sensibilidad de los aislamientos frente al fungicida captan.	61
4.3.2.1	Valores ED <sub>50</sub>	61
4.3.2.2	Dosis crítica.	62
5	DISCUSION	63
5.1	Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a seis dosis del fungicida iprodiona más el tratamiento control (0 fungicida) al tercer día de incubación.	63
5.2	Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a seis dosis del fungicida benomilo más el tratamiento control (0 fungicida) al tercer día de incubación.	67
5.3	Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a seis dosis del fungicida captan más el tratamiento control (0 fungicida) al tercer día de incubación.	70
5.4	Análisis final de los resultados obtenidos con los tres fungicidas evaluados (iprodiona, benomilo y captan) asociados a resistencia.	72

Capítulo		Página
6	CONCLUSIONES	76
7	RESUMEN	78
8	SUMMARY	80
9	BIBLIOGRAFIA	82
	ANEXOS	91



## INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Volumen (toneladas) de agroquímicos (herbicidas, fungicidas e insecticidas) importados por Chile y su valor (dólares CIF) durante la temporada 1997 a 1999.	13
2	Volumen (toneladas) de agroquímicos (herbicidas, fungicidas e insecticidas) importados por Chile y su valor (dólares CIF) durante la temporada 2000 al primer trimestre del 2001.	13
3	Ubicación geográfica del huerto y cultivar del cual proviene cada aislamiento.	28
4	Dosis crítica ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) para diferenciar aislamientos de <i>B. cinerea</i> sensibles o resistentes a benzimidazoles (benomilo), dicarboximidias (iprodiona) y ptalamidas (captan).	31
5	Determinación del grado de sensibilidad y resistencia iprodiona a partir de la inhibición del crecimiento micelial en porcentaje (%) con la dosis de $10 \mu\text{g/mL}$ .	31
6	Valores $\text{ED}_{50}$ ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) para los fungicidas iprodiona, benomilo y captan y su relación con distintos niveles de resistencia y sensibilidad.	32
7	Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> expuestos a seis dosis del fungicida iprodiona ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) más el control (dosis 0 iprodiona) después del primer día de incubación.	36

Cuadro		Página
8	Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> expuestos a seis dosis del fungicida iprodiona ( $\mu\text{g}$ i.a./mL) más el control (dosis 0 iprodiona) al segundo día de incubación.	38
9	Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> expuestos a seis dosis del fungicida iprodiona ( $\mu\text{g}$ i.a./mL) más el control (dosis 0 iprodiona) al tercer día de incubación.	41
10	Determinación de los valores $\text{ED}_{50}$ ( $\mu\text{g}$ i.a./mL) de los once aislamientos de <i>B. cinerea</i> sometidos a la acción <i>in vitro</i> del fungicida iprodiona.	44
11	Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> expuestos a seis dosis del fungicida benomilo ( $\mu\text{g}$ i.a./mL) más el control (dosis 0 benomilo) después del primer día de incubación.	46
12	Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> expuestos a seis dosis del fungicida benomilo ( $\mu\text{g}$ i.a./mL) más el control (dosis 0 benomilo) al segundo día de incubación.	48
13	Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> expuestos a seis dosis del fungicida benomilo ( $\mu\text{g}$ i.a./mL) más el control (dosis 0 benomilo) al tercer día de incubación.	49

Cuadro		Página
14	Determinación de los valores $ED_{50}$ ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) de los once aislamientos de <i>B. cinerea</i> sometidos a la acción <i>in vitro</i> del fungicida benomilo.	53
15	Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> expuestos a seis dosis del fungicida captan ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) más el control (dosis 0 captan) después del primer día de incubación.	55
16	Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> expuestos a seis dosis del fungicida captan ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) más el control (dosis 0 captan) después del segundo día de incubación.	57
17	Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> expuestos a seis dosis del fungicida captan ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) más el control (dosis 0 captan) después del tercer día de incubación.	58
18	Determinación de los valores $ED_{50}$ ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) de los once aislamientos de <i>B. cinerea</i> sometidos a la acción <i>in vitro</i> del fungicida captan.	62
19	Resumen de los resultados para cada fungicida según las dosis medianas efectivas ( $ED_{50}$ ).	73

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema representativo de la forma de siembra de <i>Botrytis cinerea</i> sobre placas con APD + fungicida.	33
2	Inhibición del crecimiento de micelio del aislamiento 8 (A8) cuando fue expuesto a 0,5 µg i.a./mL y a la dosis de 1,0 µg i.a./mL de iprodiona al tercer día de incubación.	42
3	Crecimiento de micelio en diámetro (mm) de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de arándano frente a distintas dosis del fungicida iprodiona al tercer día de incubación.	43
4	Crecimiento de micelio en diámetro (mm) de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de arándano frente a distintas dosis del fungicida benomilo al tercer día de incubación.	51
5	Inhibición del crecimiento de micelio del aislamiento 8 (A8) entre las dosis de 0,05 a 5,0 µg i.a./mL de benomilo al tercer día de incubación.	52
6	Crecimiento de micelio en diámetro (mm) de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> provenientes de arándano frente a distintas dosis del fungicida captan al tercer día de incubación	59
7	Reducción del crecimiento miceliar del aislamiento 8 (A8) entre el tratamiento testigo (0 dosis de captan) y 10,0 µg i.a./mL de captan al tercer día de incubación.	60

## INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1.1	Principales características del fungicida captan.	92
1.2	Principales características del fungicida benomilo.	93
1.3	Principales características del fungicida iprodiona.	94
2	Principales características del medio de cultivo agar papa dextrosa (APD).	95
3.1	Medición del diámetro de crecimiento (mm) <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a distintas dosis del fungicida iprodiona en el primer día de incubación.	96
3.2	Medición del diámetro de crecimiento (mm) <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a distintas dosis del fungicida iprodiona en el segundo día de incubación.	98
3.3	Medición del diámetro de crecimiento (mm) <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a distintas dosis del fungicida iprodiona en el tercer día de incubación.	100
4.1	Medición del diámetro de crecimiento (mm) <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a distintas dosis del fungicida benomilo en el primer día de incubación.	102
4.2	Medición del diámetro de crecimiento (mm) <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a distintas dosis del fungicida benomilo en el segundo día de incubación.	104
4.3	Medición del diámetro de crecimiento (mm) <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a distintas dosis del fungicida benomilo en el tercer día de incubación.	106

Anexo		Página
5.1	Medición del diámetro de crecimiento (mm) <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a distintas dosis del fungicida captan en el primer día de incubación.	108
5.2	Medición del diámetro de crecimiento (mm) <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a distintas dosis del fungicida captan en el segundo día de incubación.	110
5.3	Medición del diámetro de crecimiento (mm) <i>in vitro</i> de once aislamientos de <i>B. cinerea</i> frente a distintas dosis del fungicida captan en el tercer día de incubación.	112

## 1 INTRODUCCIÓN

Durante los últimos quince años Chile ha experimentado cambios profundos y sustanciales en su economía. Un ejemplo concreto es el desarrollo manifestado por el sector frutícola, que ha pasado a ser un rubro de importancia en las exportaciones chilenas. Es interesante señalar, además, que estos y otros esfuerzos han sido realizados en forma conjunta entre el gobierno chileno y la empresa privada.

En este contexto, el sector productor y exportador de frutales menores, ha pasado a constituir una de las áreas de mayor proyección en la fruticultura. Estos rubros presentan una demanda sostenida puesto que son considerados productos de consumo especial y que además, presentan varias alternativas de industrialización. Asimismo, poseen propiedades benéficas para la salud humana, aspectos reconocidos para los frutos de arándanos en particular.

Para Chile la producción de algunos frutales menores como lo son las frutillas, frambuesas, moras y sus híbridos, arándanos y murtas, entre otros, representan por sus ventas una cifra en torno a los US \$ 90 millones anuales. Esta es una cantidad bastante considerable y con interesantes proyecciones de seguir expandiéndose.

Uno de los frutales menores que ha suscitado gran interés lo constituye el arándano (*Vaccinium spp.*). Esta especie es originaria de Norteamérica e introducida al país a fines de los años 70. Actualmente, presenta alrededor de 1900 hectáreas de cultivo y el área de producción se extiende desde la IV a la X Región.

La relevancia de este fruto se manifiesta como una alternativa que permite diversificar las exportaciones frutícolas tradicionales, principalmente como producto fresco. Los envíos son a los países del hemisferio norte debido a las condiciones climáticas favorables de Chile y a las ventajas de producir en contra estación. Es decir, el grueso de la producción nacional se presenta cuando la oferta de fruta fresca en los mercados de América del norte, Europa y Japón es prácticamente inexistente.

Los estrictos y rigurosos controles fitosanitarios, que actualmente exigen los mercados internacionales, explican las prácticas agronómicas que habitualmente se basan en la aplicación de productos químicos. En muchos casos documentados, esta práctica ha provocado la aparición de razas, cepas o variantes de un patógeno, causante de una enfermedad, tolerantes o resistentes al producto. Esto se debe, principalmente, por la inadecuada y reiterada utilización de un mismo producto, lo que en consecuencia produce una presión de selección, eliminando a los individuos sensibles y por consiguiente la sobrevivencia y posterior multiplicación de los individuos resistentes.

Uno de los casos más destacados es el del hongo *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. causante de el "moho gris" en una gran variedad de hospederos. Para este agente se ha logrado identificar varias razas y cepas resistentes a fungicidas comúnmente aplicados en Chile, como los benzimidazoles, carboximidias y dicarboximidias.

Esta investigación plantea como hipótesis que aislamientos de *Botrytis cinerea*, provenientes de arándano "alto" (*Vaccinium corymbosum* L.) y arándano "ojo de conejo" (*Vaccinium ashei* Reade.), de la zona centro y sur de Chile, manifiestan resistencia a algunos de los fungicidas más utilizados.



Para probar tal hipótesis se plantea como objetivo general determinar si aislamientos de *B. cinerea*, obtenidos desde plantaciones de arándanos (*V. corymbosum* y *V. ashei*), ubicadas entre la Quinta y Novena Región, presentan resistencia a algunos fungicidas aplicados corrientemente en el país para su control.

Como objetivo específico de esta investigación se considera evaluar *in vitro* el crecimiento de distintos aislamientos del hongo frente a diferentes concentraciones de iprodiona, benomilo y captan, pertenecientes a distintos grupos químicos, aplicados como tratamiento para el control de *B. cinerea* en arándano.

De acuerdo a lo anterior, se determinará la presencia de resistencia en aislamientos recolectados entre la V y IX regiones a:

- 1) iprodiona (dicarboximida)
- 2) benomilo (benzimidazol)
- 3) captan (ptalamida)

## 2 REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Desarrollo de los pesticidas en la agricultura moderna.

El conocimiento de las causas de las enfermedades en las plantas permitió la búsqueda de un control más accesible trayendo como consecuencia el inicio en escala considerable de la aplicación de compuestos químicos. En especial, a partir del descubrimiento del caldo bordelés por Millardet en 1882, el que se transformaría en el primer fungicida de uso masivo empleado hasta hoy en día para el control del “mildíu de la vid”, entre otras patologías (BAUER, 1984; CIAMPI, 2002).

Los primeros intentos para el control químico ocurren con el empleo de sustancias tóxicas como el mercurio o el azufre, además de cobre, antimonio y arsénico, los cuales no eran altamente selectivos. También eran empleadas algunas sustancias orgánicas como la quinina, restos de tabaco, aceites y mezclas sin una idea clara de sus bases terapéuticas (NEWMAN, 1978; ECKERT, 1988).

Las primeras dos décadas del Siglo XX evidenciaron el fruto de la química orgánica extendida al uso de los metales para el desarrollo de compuestos órgano metálicos que en la práctica fueron selectivamente más tóxicos. En 1913, se crearon los fungicidas órgano mercuriales, desarrollados como tratamientos de semillas y como protectores de frutos y follaje. Debido a su toxicidad, estos compuestos no fueron ampliamente aceptados (BAUER, 1984; ECKERT, 1988).

El interés en la quimioterapia fue restablecido a mediados de la década de los 30 hacia la siguiente. Esto se debió, principalmente, a las limitantes que

presentaban los fungicidas protectores los cuales ofrecían la mínima confianza en el saneamiento de plantas infectadas o de controlar enfermedades vasculares, virus y patógenos del suelo. Además, cuando se utilizaban cultivares resistentes frecuentemente perdían aquella condición cuando nuevas razas de patógenos iban surgiendo (WAIN y CARTER, 1977).

Durante el período comprendido entre 1935 a 1950, se producen continuos avances en microbiología y química orgánica. Estos resultaron en el desarrollo de bactericidas altamente selectivos como sulfonamida y antibióticos como penicilina, estreptomina y clorotetraciclina (WAIN y CARTER, 1977; ECKERT, 1988).

La era moderna de los pesticidas sintéticos data desde 1939 cuando son descubiertas las propiedades insecticidas del dicloro-difenil tricloetano (DDT), el principal representante de los insecticidas organoclorados, que fue utilizado masivamente hasta finales de los 50. En los años siguientes, la investigación química de este tipo de compuestos fue dirigida a incrementar la actividad insecticida, la cual estuvo asociada en forma frecuente a la toxicidad en mamíferos y un aumento en la persistencia de residuos en el medio ambiente. Posteriormente, a mediados de la década de 1940, aparecen los insecticidas organofosforados y carbamatos (ECKERT, 1988).

La mayor parte de los fungicidas que continuaron en desarrollo presentaban múltiples sitios de acción con muchos centros nucleofílicos en la célula. Algunos de ellos fueron el captan, clorotalonil y etilen-bis ditiocarbamato. Otros fueron tóxicos de membrana como dodine y gliodin. Ninguno de estos compuestos fue selectivo, ya que su uso en plantas dependía de su exclusión del protoplasto de la planta viva para controlar la enfermedad sin dañar al hospedero. Estos también son llamados fungicidas protectores, puesto que deben ser aplicados en forma previa a la infección y tienen un efecto

terapéutico sobre el desarrollo de la enfermedad post-infección (NEWMAN, 1978; ECKERT, 1988).

Antibióticos como la estreptomicina, cicloheximida, kasugamicina y polioxina, fueron algunos de los primeros protectores de plantas sitio-específicos. En cada caso la aparición de resistencia fue muy rápida luego de su introducción. En la actualidad, los mecanismos de desarrollo de la resistencia son conocidos y es claro que su avance está dado por el potencial genético para detoxificar el antibiótico o cepas mutantes con menor grado de afinidad. El mismo patrón de resistencia fue registrado para los insecticidas (ECKERT, 1988).

Resistencia a insecticidas fue observada con posterioridad al uso del DDT y similarmente para los organofosforados y carbamatos. El principal mecanismo involucrado en la resistencia a todos estos compuestos parece ser el potencial genético de los organismos a controlar, por mutación o selección de individuos resistentes. Estos en algunos casos, presentan sistemas de detoxificación altamente eficientes en la población insecto - plaga (ECKERT, 1988).

La introducción, a finales de los 60, de fungicidas selectivamente activos, como benomilo, dimetirimol y carboxina, aumentó las posibilidades de control químico. Esto era aplicable a numerosas enfermedades causadas principalmente por hongos del Phylum Ascomycota. El efecto de estos es a través, de la movilización del producto al interior de las plantas (ECKERT, 1988; BESOAIN, 1989).

Los años 70 y 80 fueron testigos del continuo desarrollo de nuevos fungicidas altamente específicos como las fenilamidas, organofosfatos, dicarboximidias y los inhibidores del esterol. La mayoría de éstos presentan un

blanco bioquímico definido en la célula del patógeno. Usualmente un sitio en una proteína que es controlada por uno o varios genes (ECKERT, 1988; KIMURA *et al.*, 2001).

La frecuencia de casos informados en torno a la resistencia a fungicidas fue extendiéndose desde mediados de la década de los 60. Esto se produce en forma paralela a la introducción de nuevos compuestos sitio específicos para atacar a los patógenos. Estas sustancias, actúan en uno o dos procesos metabólicos, por lo tanto, los casos de resistencia son mucho más comunes debido a la alteración de un gen del hongo. Este efecto es suficiente para inducir cambios en el sitio o proceso en que actúa el fungicida (AUGER, 1989).

Según lo señalado por ECKERT (1988), la mayoría de los episodios de resistencia en campo a partir de 1970, podrían ser explicados por la aparición de mutantes poseedores de un gen mayor particular que confiere resistencia. En el pasado, los informes de resistencia a fungicidas inhibidores de la biosíntesis de esterol parecían involucrar los efectos aditivos de varios genes menores. Esto proporciona un nivel de resistencia que reduce las posibilidades de control. Además, el biotipo resistente puede ser “criado” por selección ambiental lo que favorece la multiplicación sobre otros componentes de la población.

Esta presión de selección se ha intensificado durante las dos décadas pasadas por aplicaciones reiteradas de fungicidas. Muchos de ellos tienen propiedades sistémicas y originan residuos persistentes dentro de la planta. Los argumentos toxicológicos y ambientales del continuo desarrollo de fungicidas selectivos y la historia de los pesticidas de este tipo, hace difícil a que la química orgánica sea capaz de resolver el problema de la resistencia (ECKERT, 1988).

Algunos fungicidas han sido desarrollados durante los 90 con nuevos modos de acción. En estos se incluyen las estrobilurinas, fenilpirroles, anilino pirimidinas, fenoxiquinolinas, y compuestos que activan mecanismos de defensas en la planta (KNIGHT *et al.*, 1997).

Para el futuro inmediato nuevos toxóforos están siendo identificados en un proceso al azar, teniendo como materiales primarios los productos naturales. El progreso está siendo hecho, en el sentido de desarrollar y comprender posibles blancos enzimáticos o celulares. Posterior a la identificación de blancos estables un diseño bio-racional es establecido, a través, de evaluaciones en terreno y que cumplan con algunas propiedades. Estas pueden ser la baja toxicidad en el hombre y vida silvestre en general, menor impacto ambiental y bajos niveles de residuos en alimentos y compatibilidad con los programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (IPM) (KNIGHT *et al.*, 1997).

## **2.2 Las nuevas familias de productos químicos para combatir los agentes fitopatógenos.**

Entre los fungicidas recientemente comercializados o en desarrollo, las estrobirulinas y los fenilpirroles son análogos sintéticos de productos naturales. La actividad de estrobirulinas naturales y sintéticas está en su habilidad directa en inhibir la respiración en la mitocondria. Su selectividad no está basada en diferencias en el blanco de acción mitocondrial, sino en las diferencias en la penetración y degradación en varios organismos. Algunos *B*-metoxyacrylatos naturales, entre ellos la estrobirulina A y oudemansin A son producidas por los hongos *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Singer y *Oudemansiella mucida* Hoehn, respectivamente. Programas de síntesis han sido iniciados por las compañías BASF Corporation (BASF) de Alemania e Imperial Chemical Industries (ICI) de Inglaterra, en orden a preparar análogos de los productos naturales exhibiendo niveles bajos de toxicidad en mamíferos, buena

estabilidad a la luz y propiedades sistémicas sin alguna fitotoxicidad (LEROUX, 1996).

Según LEROUX (1996), en los últimos años, se han desarrollado otras estrobilurinas que presentan un amplio espectro de control sobre hongos Ascomycota, Basidiomycota y Oomycota presentes en varios cultivos. Estos inhiben fuertemente la germinación de esporas y, consecuentemente, exhiben excelente actividad protectora como también erradicante. Esto se ha desarrollado para el caso de la “sarna del manzano” causada por *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter y los “oidios” (orden Erysiphales).

Investigaciones recientes en el terreno de los productos naturales, han llevado a la obtención de nuevos fungicidas, por ejemplo Soraphen A, de la micobacteria *Sorangium cellulosum* So. Este es un análogo semi-sintético y que al parecer presenta un amplio espectro de acción fungicida (LEROUX, 1996).

El antibiótico pirrolnitrina (fenilpirrol) es un compuesto antifúngico producido por algunas especies de *Pseudomonas spp.*, las cuales juegan un rol de biocontrol. Algunos análogos sintéticos de pirrolnitrina, como fenpiclonil y fludioxonil, han sido desarrollados como agentes cubridores de semillas contra numerosos agentes fitopatógenos. Debido a su buena estabilidad a la luz, fludioxonil puede ser utilizado como fungicida foliar para controlar *Botrytis cinerea*, *Monilinia spp.* y *Sclerotinia spp.* El espectro antifúngico de estos fenilpirroles es similar al de las dicarboximidias (iprodiona, procymidona y vinclozolina). En la mitocondria del hongo, la pirrolnitrina es capaz de interrumpir la fosforilación oxidativa y de inhibir la cadena transportadora de electrones (LEROUX, 1996).

Estudios recientes han conducido al descubrimiento de fungicidas con nuevos modos de acción. El primero, concerniente al 8-clorofenoxiquinolina LY

214352 inhibe la dihidro-ototato dehidrogenasa. Esta sustancia es una enzima envuelta en la biosíntesis de pirimidinas. Un segundo caso se refiere a las anilino pirimidinas comerciales las cuales inhiben la biosíntesis de metionina. Estas podrían ser las primeras inhibidoras de la vía de biosíntesis de un aminoácido desarrollado como fungicida. Este modo de acción es conocido para algunos herbicidas (ej: glifosato, glufosinato, sulfonilureas) (LEROUX, 1996).

Otras anilino pirimidinas han sido recientemente introducidas en países de Europa. Estas son efectivas, principalmente, contra enfermedades causadas por hongos del Phylum Ascomycota y sus tipos asexuales. Entre ellos, mepanipirima y pirimetanilo exhiben una alta actividad contra el “moho gris” (*B. cinerea*) y “sarna del manzano” (*V. inaequalis*). Estos compuestos no afectan la germinación de conidias, pero en bajas concentraciones inhiben la elongación del tubo germinativo. Su toxicidad *in vitro* sobre el crecimiento miceliar depende del medio, presentando una disminución si es enriquecido. Varios aminoácidos, particularmente metionina ha mostrado revertir la fungitoxicidad de este tipo de sustancias (LEROUX, 1996).

La realización de estudios en *B. cinerea* con sulfato marcado radioactivamente indicaría que el pirimetanilo inhibe la biosíntesis de metionina. Otro rasgo común de mepanipirima y pirimetanilo, es su habilidad de prevenir la secreción de enzimas hidrolíticas del hongo como las proteasas, celulasas, lipasas o cutinasas, todos compuestos que juegan un rol importante en el proceso de infección. En *B. cinerea*, el mismo fenómeno concierne a la lacasa y podría explicar la reducción de su actividad en uvas al ser tratadas con pirimetanilo (LEROUX, 1996).

Algunos fungicidas exhiben efectos más específicos en la producción de energía, directamente en el impedimento de la fosforilación oxidativa, como el



fluazinam. Este es una fenilpiridinamina introducida hace una par de años en Europa para el control del “tizón tardío” (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.

Algunas carboxamidas han sido recientemente desarrolladas como flutolanil y tri-flumazid. Estas muestran efectividad en el control *in vivo* de hongos patógenos del Phylum Basidiomycota, pero también son activas al ser evaluadas *in vitro* sobre blancos mitocondriales de algunos Ascomycotas. El mecanismo exacto de acción no está totalmente entendido (LEROUX, 1996).

LEROUX (1996), señala que las investigaciones actuales se concentran sobre nuevos inhibidores de la biosíntesis de esterol, en especial, escualeno epoxidasa y lanosterol ciclasa. También son conocidos nuevos fungicidas antimicrotubulares como zarilamida, que controla hongos del Phylum Oomycota y los pyridylcarbamatos que se han mostrado efectivos contra razas o cepas resistentes o sensibles a benzimidazoles.

Otro fungicida promisorio sería un inhibidor de la síntesis de melanina KTU 3616 (nombre común carpropamida) el cual bloquea la deshidratación de scicalona (LEROUX, 1996).

En el área de Fitopatología de Frutales de la Universidad de Chile, se han desarrollado estudios desde el año 1989 tendientes a cumplir con el objetivo de producir uva de calidad mediante un programa integrado de control en *B. cinerea*. Para esto, han considerado evaluar prácticas de manejo complementarias al control químico, el uso de botriticidas de distinto modo de acción a los fungicidas tradicionales y medir la eficacia de productos orgánicos naturales o de controladores biológicos. Entre los fungicidas orgánicos naturales no sintéticos se encuentra BC-1000, elaborado en base a extractos de pulpa y semilla de pomelo, el que ha sido utilizado en frutales como el arándano

alto (*Vaccinium corymbosum* L.) (BENSCH y GUERRERO, 2001; ESTERIO *et al.*, 2003).

El fungicida biológico, Trichodex es un producto formulado en base a micelio y propágulos del aislado T39 del hongo *Trichoderma harzianum* Rifaj. Al igual que el producto anterior, representa una nueva alternativa para el control de *B. cinerea* frente a las exigencias de los mercados externos, especialmente para la fruta de consumo fresco (BENSCH y GUERRERO, 2001; ESTERIO *et al.*, 2003).

### **2.3 Situación de poblaciones resistentes a fungicidas y bactericidas de fitopatógenos en Chile.**

La creación de productos químicos a nivel mundial ha surgido como una alternativa en el manejo agronómico de aquellos cultivos de trascendencia económica y en la cual Chile no ha quedado al margen.

La utilización y aplicación en Chile de productos químicos como fungicidas, bactericidas, nematocidas y pesticidas en general, es considerada una práctica habitual en la actualidad. Esto se origina como una manera de proteger los cultivos que están destinados a mercados cada vez más rigurosos y que imponen determinadas garantías fitosanitarias.

Estas prácticas, en muchos casos son directamente responsables que en poblaciones de un patógeno en particular se eliminen los individuos susceptibles y se incrementen notoriamente los resistentes, ocasionando que el potencial biológico de estos últimos sea tan alto como aquellos individuos no resistentes, generando serias consecuencias medioambientales y agronómicas circunscritas a lo que se conoce como resistencia a biocidas (CIAMPI, 2002).

A continuación, (Cuadro 1 y 2) se detallan algunas cifras de pesticidas importados en Chile desde el año 1997 al primer trimestre del 2001.

**CUADRO 1 Volumen (toneladas) de agroquímicos (herbicidas, fungicidas e insecticidas) importados por Chile y su valor (dólares CIF) durante la temporada 1997 a 1999.**

Agroquímicos	Volumen (Toneladas)			Valor (Miles US \$ CIF)		
	1997	1998	1999	1997	1998	1999
<b>Herbicidas</b>	6.682	6.332	7.047	40.948	41.323	42.980
<b>Fungicidas</b>	3.319	3.371	2.444	29.538	27.795	20.308
<b>Insecticidas</b>	4.383	4.824	4.405	28.011	27.885	25.512

FUENTE: GUERRERO (2000).

**CUADRO 2 Volumen (toneladas) de agroquímicos (herbicidas, fungicidas e insecticidas) importados por Chile y su valor (dólares CIF) durante la temporada 2000 al primer trimestre del 2001.**

Agroquímicos	Volumen (Toneladas)			Valor (Miles US \$ CIF)		
	2000	*E-M 2000	*E-M 2001	2000	*E-M 2000	*E-M 2001
<b>Herbicidas</b>	7.850	2.038	1.605	43.508	9.038	6.747
<b>Fungicidas</b>	2.667	651	613	26.677	4.995	5.287
<b>Insecticidas</b>	4.920	935	1.110	26.035	4.554	5.366

\* E y M indican los meses de Enero y Marzo respectivamente.

FUENTE: GUERRERO (2001).

Desde la creación de los fungicidas sitio específicos benzimidazólicos hasta las dicarboximidias, la frecuencia de casos asociados al problema de la resistencia, ha significado enormes pérdidas. Esto se ha observado para un gran número de cultivos por la ineficiencia de éstos, en el control de la enfermedad. Es posible ilustrar el caso de *B. cinerea*, agente causal del "moho gris" en el cual se ha podido detectar cepas resistentes a benzimidazoles aisladas desde frambueso en varias localidades del país, como lo ejemplifican

trabajos realizados por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) en el año 1979. Otros casos asociados se presentan en estudios realizados en arándano y uva de mesa y vinífera (ALVAREZ, 1989; CARREÑO y ALVAREZ, 1989; CIAMPI, 2002).

Según Carreño y Pinto de Torres (1979) citados por ALVAREZ (1989), en el año 1978 se determinó la existencia de razas tolerantes de *V. inaequalis* de un huerto de manzanos de la zona de Los Niches, Curicó, en el que las aplicaciones de Benlate (benomilo) y Cercobin M (metil tiofanato) habían fallado en el control de la enfermedad.

Según lo señalado por Gómez (1984) citado por VASQUEZ (1995), éste observó un cierto grado de resistencia a captan en cepas de *Botrytis* provenientes de parronales de la zona central. Estas cepas lograron crecer en agar papa dextrosa (APD) con 10 ppm de fungicida.

Morales (1978) citado por ALVAREZ (1989), señala resistencia en aislamientos de *Penicillium digitatum* Sacc. Estos se obtuvieron en tres localidades de la zona central, donde habitualmente se había aplicado Benlate 50 PM (benomilo) para el control del "moho de los cítricos". El uso exclusivo del producto anterior también entregó como resultado la obtención de aislamientos resistentes de *P. expansum* en manzanas afectadas por el hongo, provenientes de Colchagua. Cabe mencionar la tolerancia presentada por algunas poblaciones de *P. italicum* a fungicidas de postcosecha en cítricos (CIAMPI, 2002).

En el período de 1985 a 1989 se logró establecer la sensibilidad y resistencia leve a iprodiona (dicarboximida) de un grupo de cepas de *Botrytis* aisladas desde frutales de la zona central (ASTORGA, 1990). Los aislamientos sensibles se inhibieron totalmente con 2 mg i.a./L en contraste con cepas de

bajo nivel de resistencia en que se obtuvo una inhibición total con mas de 10 mg i.a./L. Las dosis medianas efectivas ( $ED_{50}$ ), para aislamientos sensibles fluctuaron entre 0,11 y 1,08 mg i.a./L, mientras, el  $ED_{50}$  de la muestra resistente fue de 3,4 mg i.a./L, considerada levemente resistente.

Desde diferentes parronales de uva de mesa de la zona central del país, OCHAGAVIA (1990), obtuvo aislamientos de *B. cinerea*, los cuales fueron estudiados con el propósito de evaluar su respuesta frente a vinclozolina (dicarboximida). Los resultados obtenidos mostraron la presencia de aislamientos sensibles (mínima inhibición del micelio con 0,025 mg i.a./L y total inhibición con 2 mg i.a./L), y con un bajo nivel de resistencia (mínima inhibición con 1 mg i.a./L y una inhibición total con 20 mg i.a./L). Los  $ED_{50}$ , para aislamientos sensibles fluctuaron entre 0,094 y 1,94 mg i.a./L, mientras que para aislamientos con un bajo nivel de resistencia fluctuaron entre 2,07 y 4,98 mg i.a./L.

ALVAREZ (1991), estudió el comportamiento de aislamientos de *B. cinerea* derivados de vides, el cual resultó en el desarrollo de razas resistentes a benzimidazoles, pero sensibles a dietofencarb (S-32165), en tanto que las sensibles a benzimidazoles fueron insensibles a dietofencarb. Por lo tanto, el ensayo arrojó resistencia cruzada negativa entre estos fungicidas.

Trabajos de VASQUEZ (1995); MONTEALEGRE y VASQUEZ (1996), señalan la resistencia de cepas de *B. cinerea* a benzimidazoles, carboximidias y dicarboximidias, aisladas desde peras. Éstos encontraron cepas con altos niveles de resistencia a benomilo cuyos micelios fueron capaces de crecer hasta con 200 ppm i.a. En el caso de captan e iprodiona, algunos aislamientos crecieron hasta con de 10 ppm i.a respectivamente.

ESPEJO (1995), estudió la resistencia de conidias a benzimidazoles y dicarboximidas en cepas de *Botrytis* obtenidas de frutos de kiwi. Éste encontró que todas las muestras evaluadas fueron resistentes a benomilo y tiabendazol, existiendo resistencia cruzada entre ellos, mientras que para las dicarboximidas (iprodiona y vinclozolina), sólo un aislamiento presentó un bajo nivel de resistencia a iprodiona y las demás fueron sensibles a ambos fungicidas.

Con la técnica de germinación conidial (GC) y el crecimiento radial (CR) de micelio ALVAREZ (1996), logró determinar distintos niveles de resistencia de distintas cepas de *B. cinerea*, a tres grupos de fungicidas (benzimidazoles, dicarboximidas y dicluofluanidos), encontrando una asociación directa entre la concentración de ingrediente activo y el porcentaje de inhibición por ambos métodos, en los tres fungicidas empleados. Las muestras consideradas como sensibles o resistentes por CR mantuvieron esa condición al evaluar su respuesta a los fungicidas mediante la GC.

MARCHANT y PINTO (1999), realizaron un estudio para determinar niveles de resistencia de veinte aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de peras cv. Packham's Triumph, de diferentes zonas productoras, antes y después de la guarda en cámaras de atmósfera controlada. Ellos utilizaron distintas concentraciones de ingrediente activo para los fungicidas benomilo (Benlate), captan (Captan 80% WP) e iprodiona (Rovral). Los resultados demostraron que 18 de los 20 aislamientos fueron resistentes a benomilo; se estableció una pérdida de sensibilidad para el fungicida captan en todos los aislamientos, y 17 de los 20 aislamientos presentaron niveles variables de resistencia a iprodiona.

VALDES (2000), estudió el comportamiento de fungicidas mediante técnicas *in vitro* e *in vivo* hacia aislamientos resistentes y sensibles a dicarboximidas y botriticidas, de *B. cinerea* en vides. En laboratorio, para los individuos sensibles y resistentes, ciprodinilo fue el más eficiente, siendo

distinto a todos los demás tratamientos, seguido por fenbuconazol y tebuconazole. En pruebas *in vivo*, para las razas sensibles y resistentes, los fungicidas botriticidas, tebuconazole, fenbuconazol y prochloraz, demostraron que su eficiencia en el control del hongo no varió de acuerdo a la sensibilidad o resistencia de éste hongo a las dicarboximidias. Por otro lado, iprodiona y fenhexamid, lograron un control total de las razas sensibles, y menos eficientes en relación a las razas resistentes. En ambas pruebas, se pudo comprobar que captan y folpet, presentaron una baja eficiencia en el control, tanto de las razas sensibles como de las razas resistentes de *Botrytis* a dicarboximidias.

Investigaciones realizadas por ROSALES (2000), sobre aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de vides de diferentes zonas productoras del país, demostró la existencia de resistencia del hongo al fungicida captan (Captan 83% WP), ya que al compararlo con otro fungicida como tebuconazole (Horizon 25% WP), el primero no presentaba un gran control sobre el patógeno, ni tampoco evitaba su crecimiento.

En poblaciones bacterianas también se han desarrollado dificultades de manejo y control por el auge de la resistencia a fármacos. Tradicionalmente el control de bacterias se ha basado en aplicaciones preventivas de productos en base a sales de cobre y en algunas veces de antibióticos. Algunas variantes de *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (Pierce) Dye ocasionante de la "peste negra del nogal" se han hecho insensibles a productos inorgánicos cúpricos (AGURTO *et al.*, 2000; CIAMPI, 2002).

*Clavibacter michiganense* subsp. *Michiganense* (Smith) Davis *et al.*, agente causal del "cancro bacteriano del tomate" ha desplegado resistencia a bactericidas como estreptomycin en el valle de Quillota (V Región de Chile) (CIAMPI, 2002).

## 2.4 Procedimientos para la detección de resistencia a fungicidas.

El principio del monitoreo, para la comprobación de la resistencia a fungicida, es observar el comportamiento de un hongo y comparar su respuesta con los aislamientos sensibles de la misma especie expuestos al producto químico. Cualquier técnica de evaluación de resistencia debe ser adaptada de acuerdo al modo de acción del fungicida y el hábito de crecimiento del hongo sometido a estudio.

Para el estudio, es importante considerar diferentes métodos para almacenar los aislamientos colectados en terreno. Para el caso de *B. cinerea*, el hongo puede ser almacenado en sílica gel, arena, o agar papa dextrosa inclinado, todos a 4 ° C, como esporas secas a 20 ° C ó como esporas en glicerol a - 20 ° C (DELCAN *et al.*, 2002).

Los efectos de los fungicidas benzimidazólicos son determinados mediante el crecimiento del tubo germinativo de la spora, el crecimiento radial de la colonia y el control de la enfermedad en plantas tratadas (TRIVELLAS, 1988).

El crecimiento del tubo germinativo provee una estimación exacta de un aislamiento sensible por el modo de acción de los benzimidazoles. Estos ligan la tubulina, proteína estructural del huso mitótico, lo que en consecuencia produce un bloqueo de la mitosis. Entonces, las paredes celulares de las esporas germinativas de los aislamientos sensibles, al ser colocadas en agar con fungicida no formarán el tubo germinativo, por lo que el crecimiento se detiene (TRIVELLAS, 1988; BESOAIN, 1989).

Las esporas del procedimiento anterior son llevadas a placas Petri las cuales contienen dos tipos de medio, uno con fungicida y otro sin fungicida, por lo cual la respuesta de un aislamiento a una concentración dada puede ser



determinada. El crecimiento del tubo germinativo puede ser observado luego de 24 a 48 h. El beneficio de este método es proveer una estimación rápida de respuesta incluso para un crecimiento lento del hongo y la desventaja es la de examinar un gran número de muestras bajo el microscopio (TRIVELLAS, 1988).

El crecimiento radial es también utilizado para evaluar la resistencia o sensibilidad, particularmente en hongos de crecimiento rápido. Para el monitoreo de resistencia a dicarboximidias, *B. cinerea* puede ser aislado y sembrado en un medio agar simple, como extracto agar malta al 2 % para un rápido crecimiento y desarrollo de conidias (LORENZ, 1988).

Para evaluar un gran número de aislamientos se puede realizar una valoración cualitativa inicial. Esto es, emplear una concentración crítica de fungicida que sea capaz de distinguir claramente entre aislamientos sensibles y resistentes. De esta forma se puede comparar el crecimiento o la inhibición de éste entre cultivos no tratados y aquellos bajo la influencia del fungicida. Tal distinción, puede ser ejecutada para dicarboximidias empleando una concentración de 1 o 2 µg i.a./mL, para benzimidazoles 5 µg i.a./mL y para ptalamidas de 2 µg i.a./mL (TRIVELLAS, 1988; VASQUEZ, 1995; LA MONDIA y DOUGLAS, 1997).

Según RAPOSO *et al.*, (1995) para medir la sensibilidad a fungicida en una población de un patógeno no obligado, es necesario determinar la dosificación a la cual el diámetro de la colonia en un medio de agar con fungicida es reducido a la mitad ( $ED_{50}$ ), que el diámetro de la colonia en un medio agar libre de fungicida. Estos se pueden calcular, a través, de análisis de regresión del logaritmo de la concentración (mg i.a./L), versus el porcentaje de inhibición respecto al testigo sin fungicida. La desventaja principal de este método es que sólo mide el crecimiento lineal y la densidad de la colonia no es considerada.

TORRES *et al.*, (1990), determinaron el comportamiento de dos fungicidas comerciales (benomilo e iprodiona) y experimentales en la inhibición *in vitro* de *B. cinerea* aislado desde frambueso (*Rubus idaeus* L.). Para esto, seleccionaron frutos, los cuales fueron almacenados por un par de días a 0 ° C y dejados un día a temperatura ambiente para luego determinar la presencia o ausencia de *B. cinerea* endógena. Los fungicidas fueron adicionados a el medio de cultivo APD en placas Petri, en las siguientes concentraciones: 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 mg i.a./L. La presencia del hongo permitió aislamientos los que fueron incubados por 48 horas (denominados cultivos nuevos) sin esporular. Mediante un sacabocado estéril extrajeron desde los bordes de crecimiento de la colonia un cilindro que contenía micelio del hongo el cual fue colocado en placas de APD + fungicida mantenidas a 22 ° C por 48 h.

Al cabo de este tiempo, se estableció el crecimiento de la colonia mediante dos mediciones efectuadas en ángulo recto. A la cifra resultante se le restó el diámetro del cilindro original de agar con inóculo. El porcentaje de inhibición para cada concentración/fungicida se determinó relacionando el crecimiento de los discos con fungicida, con los discos testigos sin fungicida. Cabe señalar, que la base de esta metodología también ha sido realizada por CARREÑO y ALVAREZ, (1989); LATORRE *et al.*, (1994); TORTORA *et al.*, (1994); LA MONDIA y DOUGLAS, (1997).

Otro método, que permite un análisis cualitativo rápido es la prueba de difusión en agar. Para aplicarla, es esencial que el aislamiento produzca suficientes conidias. Esto puede hacerse exponiendo los cultivos frente a luz ultravioleta. Posteriormente, las conidias son llevadas a la superficie de placas Petri conteniendo agar, después se colocan discos de papel filtro impregnado con fungicidas sobre la superficie con agar. La evaluación de los cultivos se realiza 2 a 3 días después, registrando la zona de inhibición en los papeles filtro. Una de las ventajas de este método es que permite evaluar varias

concentraciones de fungicida como el control en una única placa Petri. Se pueden determinar niveles de resistencia de esas cepas por la transferencia de masa micelial, en un rango de concentraciones de fungicidas adicionados al agar (LORENZ, 1988).

Una técnica más puntual, es medir la inhibición del peso seco en un medio líquido, conteniendo diferentes concentraciones de fungicida. Este último involucra más tiempo que el anterior (LORENZ, 1988).

También se ha desarrollado un método cuantitativo automatizado (AQ) para medir el incremento de la biomasa del hongo. En este, el hongo se desarrolla en un microdisco, al tiempo que este crecimiento es monitoreado espectrofotométricamente. La absorbancia es medida en un rango de 0.0-0.6 unidades, relacionadas directamente al peso seco de la colonia del microdisco. Este ensayo ofrece la oportunidad de medir la inhibición de la biomasa del hongo en presencia de fungicida, superando las desventajas discutidas en los métodos anteriormente expuestos. El método es rápido, reproducible y fácil lo que hace de éste un procedimiento conveniente para un asertivo diagnóstico de la resistencia a fungicida, en una población de un hongo (RAPOSO *et al.*, 1995).

## **2.5 *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.**

A continuación se describen los aspectos más relevantes de esta especie:

**2.5.1 Aspectos generales.** Según Ciampi *et al.*, (1993) citados por PEREZ (2004), el hongo *B. cinerea* es un patógeno común de plantas como hortalizas, cultivos ornamentales, viveros y frutos almacenados. Puede atacar plantas enteras o sus partes en el campo, como también sus productos después de cosechados, dando lugar a la llamada pudrición gris o moho gris.

Probablemente la mayoría de las pudriciones que ocurren en productos almacenados comienzan en el campo y escapan a la detección, debido a que muchas de estas infecciones son latentes.

Según Maude (1980), citado por PEREZ (2004), las especies de *Botrytis* afectan las estructuras vegetativas y florales de muchos cultivos de plantas a través de su estación de crecimiento, causando frecuentemente reducciones en la calidad y en los rendimientos.

**2.5.2 Clasificación taxonómica.** Según Ulloa y Hanlin (2000), citados por MILANCA (2001), *B. cinerea* se clasifica de la siguiente manera:

- Dominio: Eucariota
- Reino: Mycota
- Phylum: Ascomycota
- Clase: Deuteromycete
- Familia: Moniliaceae
- Género: *Botrytis*
- Especie: *Botrytis cinerea*

**2.5.3 Condiciones ambientales para su desarrollo.** Para la producción de esporas, la temperatura debe ser de 15 a 20 ° C. La germinación de ellas ocurre alrededor de los 20 ° C, y la formación de esclerocios se ve favorecida por temperaturas de 11 a 15 ° C. El patógeno muestra actividad a bajas temperaturas (entre 0 y 10 ° C) y produce pérdidas importantes en cultivos que han sido almacenados a esas temperaturas (AGRIOS, 1996).

Auger (1983), citado por PEREZ (2004), señala que en relación a la humedad relativa, cambios rápidos entre los límites de 65 a 85% son importantes en la liberación de esporas. Además, señala que precipitaciones

intensas y acompañadas de viento, generalmente causan abundante dispersión de esporas.

En general le favorecen los ambientes húmedos y templados. Periodos con agua libre o humedad relativa superior al 95% y temperaturas entre 18 y 25° C son altamente predisponentes (LATORRE, 1997).

Según AGRIOS (1996), este patógeno, aparece abundantemente a través del año como un saprófito y parásito facultativo, volviéndose en ocasiones muy agresivo si las condiciones son favorables (clima húmedo y templado frío, lluvia y rocío), cobrando gran importancia económica, especialmente en áreas templadas del mundo.

## **2.6 *Vaccinium spp.***

A continuación se describen los aspectos más relevantes de estas especies.

**2.6.1 Aspectos generales.** Son especies arbustivas llamadas comúnmente “arándanos” o “blueberries” cuyo origen geográfico se encuentra en el hemisferio norte, especialmente Norteamérica y Europa (MEDEL, 1988 y BUZETA, 1997). Pertenecen a la familia Ericaceae existiendo tres tipos: el arándano “alto” (Highbush) *Vaccinium corymbosum* L., el arándano “ojo de conejo” (rabbiteye) *Vaccinium ashei* Reade y el arándano “bajo” (lowbush) *Vaccinium angustifolium* Ait. (SUDZUKI, 2002).

El cultivo comercial se inició con selecciones y mejoramiento vegetal a partir de de las especies *V. corymbosum* y *V. australe* Small a principios de siglo pasado (MEDEL, 1988; BUZETA, 1997; SUDZUKI, 2002).

EE.UU es el principal productor, consumidor, exportador e importador de arándanos del mundo. Junto a Canadá abarcan el 90% del área productiva

total, seguida de Chile (pionero del cultivo en el hemisferio sur), Argentina, Nueva Zelanda, Australia y Sudáfrica. Canadá es el principal proveedor de arándanos congelados del mundo, pero a diferencia de EE.UU., la producción canadiense es mayoritariamente del tipo silvestre (BUZETA, 1997; GAMEZ, 2002).

Chile y Argentina ofertan en estado fresco a los principales mercados ubicados en el hemisferio norte cuando éstos se encuentran en su estación invernal y no pueden abastecerse con su producción local (BUZETA, 1997; GAMEZ, 2002).

**2.6.2 Cultivo del arándano en Chile.** Se introdujeron a principios de la década de los ochenta alcanzando un mayor grado de expansión sólo a partir de los 90. Actualmente se desarrollan desde la Quinta hasta la Décima Región, pero especialmente desde la Séptima Región hacia el sur (GAMEZ, 2002).

El establecimiento de cultivares en áreas de la zona central se debe a la búsqueda de una mejor oportunidad de colocación en el mercado externo. Para ello ha sido necesario la aplicación de tecnología para modificar las características de acidez y porosidad de los suelos e igualmente en el agua de regadío para la obtención de fruta temprana (GAMEZ, 2002).

**2.6.3 Clasificación taxonómica.** Según STRASBURGER *et al.*, (1994) el arándano se clasifica de la siguiente manera:

- Subdivisión: Angiosperma
- Clase: Dicotiledónea
- Orden: Ericales
- Familia: Ericaceae
- Género: *Vaccinium*
- Nombre común: arándano, blueberry.

**2.6.4 Descripción botánica.** *Vaccinium spp.* agrupa a arbustos erectos deciduos o siempreverdes, de hasta 4 m de altura. Presentan hojas alternas, cortamente pediceladas, enteras o serradas (WESTWOOD, 1982; SUDZUKI, 2002).

Las flores son axilares o terminales, en racimo. Estas últimas son gamopétalas con corola acampanada de 4 a 5 lóbulos. Presencia de 8 a 10 estambres con anteras o sin aguijón. El ovario es ínfero con 4 a 10 lóculos (WESTWOOD, 1982; SUDZUKI, 2002).

El fruto es una falsa baya esférica, de color azul metálico con 8 - 18 semillas blandas en su interior (WESTWOOD, 1982; SUDZUKI, 2002).

**2.6.5 Cultivares.** En la actualidad se han producido un número creciente de cultivares, que en Estados Unidos alcanzan a más de 50 para el caso del arándano “alto” y de más de 30 para el “ojo de conejo”. Todas ellas han sido producidas por el USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE), instituciones estatales de investigación, o por programas cooperativos entre estos centros (BUZETA, 1997).

Los cultivares se agrupan tomando en consideración algunas características sobresalientes:

a) arándano alto de bajo requerimiento de frío. En este grupo se incluyen cultivares como: O'Neal, Blueridge, Cape Fear, Sharpblue, Avonblue, Georgiagem, Cooper y Gulf Coast. La principal característica de estas variedades es el bajo requerimiento de frío invernal, lográndose producciones muy tempranas y tardías en zonas como Florida, Carolina del Norte, y California (BUZETA, 1997).

Según GAMEZ (2002), el cultivar más importante de este grupo para Chile es O`Neal cuya producción se inicia hacia fines de noviembre en el centro del país.

b) arándanos de alto requerimiento de frío. Aquí se encuentran los cultivares tradicionales:

-tempranas: Duke, Sunrise, Bluechip, Spartan.

-media estación: Bluejay, Bluecrop, Sierra, Nelson, Darrow, Blueray, Patriot.

-tardías: Brighitta, Elliot.

En Chile Elliot permite obtener una producción de fruta más tardía hacia fines de marzo y principios del mes de abril (BUZETA, 1997 y GAMEZ, 2002).

c) arándanos de tamaño medio. En este grupo se ubican una serie de cultivares que han resultado de la hibridización del tradicional arándano “alto” con el arándano “bajo” (lowbush). El objetivo de la creación de estos es la obtención de arbustos más resistentes a condiciones de frío extremo y nieve en invierno, junto con un menor tamaño de la planta (BUZETA, 1997).

Destacan en este grupo Northland, Northblue, Tophat, Northsky, Northcountry.

d) arándanos ojo de conejo (Rabbiteye). Los cultivares de este grupo presentan en general una mayor adaptabilidad a condiciones edáficas adversas y, por lo general, su producción es más tardía que el arándano alto. La planta es de mucho mayor tamaño, por lo que se requieren mayores distancias de plantación, y la fruta por lo general no goza de las mismas cualidades organolépticas que el arándano alto (BUZETA, 1997).



### 3 MATERIAL Y METODO

#### 3.1 Material

A continuación se describen los materiales y equipamientos que fueron utilizados para el desarrollo de esta investigación.

**3.1.1 Ubicación.** El ensayo fue realizado y desarrollado en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, localizado en el campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia.

**3.1.2 Material biológico.** Aislamientos de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., obtenidos desde plantas de arándanos (*V. corymbosum* L. y *V. ashei* Reade.). Estos se realizaron a partir de frutos con presencia visible de “moho gris”.

Este material es mantenido como parte de una colección de aislamientos en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias en la Universidad Austral de Chile.

**3.1.3 Origen de los aislamientos.** Los aislamientos de *B. cinerea* utilizados en este trabajo procedieron de una colección mantenida en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Austral de Chile. Éstos fueron colectados durante la temporada 2002 – 2003.

A continuación en el Cuadro 3, se señala la procedencia de cada aislamiento de *B. cinerea* (región y localidad), número asignado y el cultivar de arándano al que pertenece (*V. corymbosum* o *V. ashei*).

**CUADRO 3 Ubicación geográfica del huerto y cultivar del cual proviene cada aislamiento.**

<b>Nº Aislamiento</b>	<b>Región</b>	<b>Localidad</b>	<b>Cultivar</b>
1	RM	Lampa	O` Neal
2	V	Petorca	Marimba
3	VI	Colchagua	Misty
4	VIII	Ñuble	Premier *
5	VIII	Bío - Bío	O` Neal
6	VIII	Bío - Bío	Blueray
7	IX	Cautín	Bluegold
8	IX	Malleco	Bluejay gold
9	IX	Malleco	Bluecrop
10	IX	Malleco	Blueray
11	IX	Malleco	O` Neal

\* Corresponde a *Vaccinium ashei* Reade.

**3.1.4 Equipos y material de laboratorio.** Los implementos usados en el laboratorio se indican a continuación:

- Instrumentos ópticos: microscopio óptico: aumento máximo 1000X (Matic), lupa: aumento máximo 50X (Leica).
- Instrumentos de precisión: balanza analítica (Sartorius) grado de precisión: 0,1 mg, pie de metro digital (Mitutoyo).
- Material de vidrio: placas Petri de 10 y 6 cm de diámetro, matraces de aforo de 100 y 1000 mL matraces Erlenmeyer de 500, 1000 y 2000 mL, tubos de ensayo de 10 x 1.2 cm, probetas, pipetas de 10 mL, vaso precipitado de 50 y 200 mL.

- Equipos: Autoclave pequeño de control manual, autoclave (Quimis) ISO 9002, incubadora o estufa de cultivo (Mettler), estufa esterilizadora de aire caliente (Mettler), microonda (Somela), cámara de flujo laminar (Labconco), agitador magnético (Sybron Thermolyne), refrigerador (Fensa) y cámara fotográfica digital (Sony).
- Otros: papel de envolver, papel aluminio, papel film, bolsas de polietileno transparentes, toalla de papel, algodón cardé, algodón hidrófilo e hidrófobo, agua destilada, agua estéril, alcohol de quemar, alcohol etílico 96 °, espátulas, propipeta, magnetos, tijera, aguja enmangada, sacabocado (9 mm de diámetro), guantes de látex, mascarilla, mechero, regla, marcador permanente y cuaderno para anotaciones.

**3.1.5 Productos químicos.** Se utilizaron los siguientes fungicidas comerciales: iprodiona (Rovral 50% PM), benomilo (Polyben 50% PM) y captan (Captan 80% PM). (Ver composición de cada uno de los fungicidas en los Anexos 1.1, 1.2 y 1.3).

**3.1.6 Medio de cultivo.** El medio utilizado para el crecimiento *in vitro* del micelio del hongo en estudio correspondió a agar papa dextrosa (APD) (Merck). (Ver composición del medio en el Anexo 2).

## **3.2 Método.**

La metodología que se utilizó para elaborar el ensayo de resistencia en aislamientos de *B. cinerea* es la siguiente:

**3.2.1 Selección de los aislamientos.** De la colección de aislamientos mantenida en el Laboratorio de Fitopatología se seleccionaron al azar once aislamientos, cada uno de ellos perteneciente a un huerto en particular. Cada

aislamiento procede de un cultivar específico ya sea de arándano “alto” u “ojo de conejo”.

**3.2.2 Identificación del hongo y conservación de los aislamientos.** La identificación de la especie *B. cinerea* se realizó mediante una examinación macroscópica con lupa, para verificar la formación de colonias de coloración típica grisácea, con desarrollo de esclerocios de color negrusco de aproximadamente 2 milímetros de diámetro. Al realizar preparaciones microscópicas del micelio del hongo, se observaron conidióforos de color gris oscuro en cuyos ápices ramificados presentaron conidias ovaladas, hialinas a levemente grises, característicos de *B. cinerea*.

Los cultivos puros del hongo fueron almacenados en tubos de ensayo con 2,5 mL de agar papa dextrosa inclinado, a una temperatura de  $\pm 4^{\circ}$  C. Posteriormente, cada aislamiento fue cultivado en una placa Petri con APD para la obtención de cultivos frescos al cabo de 2 días de incubación en estufa de cultivo a una temperatura  $\pm$  de  $22^{\circ}$  C.

**3.2.3 Evaluación de resistencia.** Se realizó un ensayo *in vitro* para determinar la resistencia que posean los distintos aislamientos frente a tres fungicidas comúnmente usados para el control de *B. cinerea*: un benzimidazol Polyben 50% WP (i.a benomilo), una dicarboximida Rovral 50% WP (i.a iprodiona) y una ptalamida Captan 80% PM (i.a captan).

Para estimar las concentraciones de cada fungicida a utilizar se revisó en la literatura con el fin de obtener las concentraciones críticas que se han manejado en trabajos realizados en Chile como en el extranjero, ello para poder distinguir entre aislamientos sensibles y resistentes (Cuadro 4). En base a ello, se establecieron las concentraciones usadas, las cuales fueron para los tres fungicidas: 0 (control); 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0 ( $\mu$ g i.a./mL).

**CUADRO 4 Dosis crítica ( $\mu\text{g}$  i.a./mL) para diferenciar aislamientos de *B. cinerea* sensibles o resistentes a benzimidazoles (benomilo), dicarboximidias (iprodiona) y ptalamidas (captan).**

Fungicida	( $\mu\text{g}$ i.a./mL)	Crecimiento micelio
Benomilo	5,0	+*
Iprodiona	2,0	+*
Captan	2,0	+*

+\* = crecimiento de micelio de *B. cinerea* a las concentraciones señaladas.

FUENTE: Beever y Brien (1983) citados por VASQUEZ (1995).

Para la determinación de aislamientos sensibles o con un cierto nivel de resistencia a iprodiona, se evaluó en base a la inhibición micelias ( $\%$ ) a partir de la dosis de  $10,0 \mu\text{g}$  i.a./mL (detalle en Cuadro 5).

**CUADRO 5 Determinación del grado de sensibilidad y resistencia a iprodiona a partir de la inhibición del crecimiento micelial en porcentaje ( $\%$ ) con la dosis de  $10,0 \mu\text{g}$  i.a./mL.**

Inhibición crecimiento micelial	( $\%$ )	Aislamiento
ICM	> 95	sensible
ICM	51 - 95	Bajo nivel de resistencia
ICM	< 50	Alto nivel de resistencia

ICM: Inhibición crecimiento de micelio.

FUENTE: LATORRE *et al.* (1994).

Para el caso de benomilo y captan la condición de un aislamiento sensible o resistente se basó en el crecimiento según las concentraciones críticas determinadas para estos fungicidas (Cuadro 4).

Además, se determinaron los valores  $ED_{50}$  para los tres fungicidas, asociados al porcentaje de inhibición de los aislamientos en relación al testigo sin fungicida a partir de los datos obtenidos durante el tercer día de incubación.

A continuación en el Cuadro 6 se presentan los valores  $ED_{50}$  expresados para cada uno de los fungicidas involucrados en este ensayo.

**CUADRO 6 Valores  $ED_{50}$  ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) para los fungicidas iprodiona, benomilo y captan y su relación con distintos niveles de resistencia y sensibilidad.**

<b>Aislamiento</b>	<b>iprodiona</b>	<b>benomilo</b>	<b>captan</b>
sensible	$ED_{50} \leq 2$	$ED_{50} \leq 5$	$ED_{50} \leq 2$
Bajo nivel de resistencia	$ED_{50} 2 - 10$	$ED_{50} 5 - 10$	$ED_{50} 2 - 10$
Alto nivel de resistencia	$ED_{50} > 10$	$ED_{50} > 10$	$ED_{50} > 10$

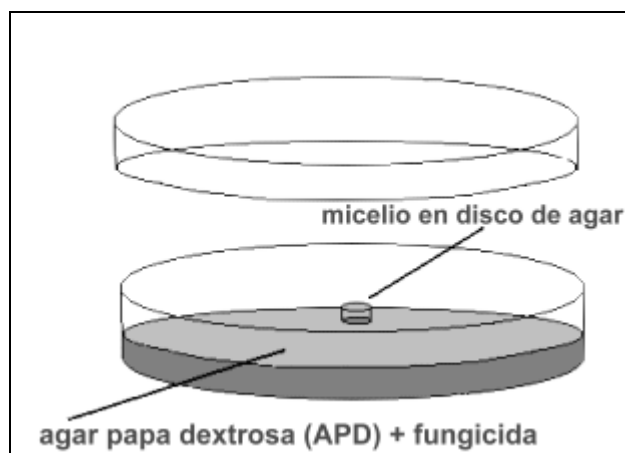
FUENTE: CARREÑO y ALVAREZ (1989), OCHAGAVIA (1990), LATORRE *et al.*, (1994), VASQUEZ (1995), LA MONDIA y DOUGLAS (1997), MUÑOZ *et al.*, (1999).

**3.2.4 Preparación y siembra.** Para preparar los medios con las distintas concentraciones de los tres fungicidas, se calculó la cantidad de cada producto que tuviera la concentración de ingrediente activo adecuado, para la preparación de soluciones “madres” (10 %). Éstas soluciones diluidas en agua destilada estéril fueron incorporadas a la solución de agar, cuando ésta alcanzó una temperatura entre 40 a 50 ° C, inmediatamente después a la esterilización del medio a 1 atmósfera de presión (121 ° C), durante 15 minutos en autoclave.

La siembra de discos de agar con micelio del hongo de 0.9 cm de diámetro se obtuvo con un sacabocado estéril de la zona de avance de una

colonia de 2 días de incubación, de cada aislamiento del hongo. Este fue colocado individualmente al centro de una placa Petri, que contenía 20 mL de medio de cultivo agar papa glucosa, suplementado con una concentración determinada de fungicida, dejando en contacto el micelio del disco con el medio de cultivo.

El parámetro de evaluación fue el crecimiento diametral del micelio de cada aislamiento, el que se obtuvo estimando el crecimiento a las 24, 48 y 72 horas (durante tres días) efectuándose las medidas diarias del diámetro (mm/día) con la ayuda de un pie de metro digital.



**FIGURA 1** Esquema representativo de la forma de siembra de *Botrytis cinerea* sobre placas con APD + fungicida.

Adaptado de PEREZ (2004).

**3.2.5 Diseño experimental.** Las placas con todos los aislamientos se colocaron a temperatura ambiente, evaluando diariamente el crecimiento micelial del hongo por un período de 3 días. Para este propósito se midió el diámetro de desarrollo de la colonia de *B. cinerea* en forma de cruz (ángulo recto) a partir del centro de la placa, obteniendo en cada medición dos valores, expresados en milímetros.

Estos valores fueron promediados obteniendo un valor medio por evaluación, al cual se le resto los 9 milímetros correspondientes al diámetro inicial de disco de micelio de *B. cinerea* inoculado al centro de la placa.

Se efectuaron cuatro repeticiones para cada dosis de cada fungicida a utilizar, incluido el testigo (dosis 0).

**3.2.6 Análisis estadístico.** Las evaluaciones fueron sometidas a un Test estadístico no paramétrico de Kruskal- Wallis.

Para aquellas variables en que se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los tratamientos, se aplicó el Test de Mann Whitney con un 95 % de confianza.

El análisis de Kruskal-Wallis y Mann Whitney se realizaron con el paquete estadístico STATISTICA 6.0, versión 1997.

Para estimar los valores  $ED_{50}$  de cada aislamiento con los tres fungicidas se realizó un análisis de regresión entre el logaritmo de la concentración de fungicida y el porcentaje de inhibición del hongo. Estos valores se calcularon en una planilla Excel determinada para esto, perteneciente al Departamento de Biología Aplicada para la defensa de las Plantas (Universidad de Udine, Italia) facilitada por el Laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.



## 4 PRESENTACION DE RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en los experimentos realizados con once aislamientos de *B. cinerea* y su respuesta a tres fungicidas.

Los resultados de las mediciones del crecimiento micelial diario promedio en diámetro (milímetros) para todos los aislamientos y sus tratamientos: testigo (0 fungicida); 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0 µg de i.a./ mL de medio, se pueden observar en los anexos respectivos.

### 4.1 Iprodiona.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los aislamientos en relación a su comportamiento frente al fungicida iprodiona.

**4.1.1 Crecimiento de *B. cinerea* sobre distintas concentraciones del fungicida iprodiona en cada uno de los tres días de incubación.** En el Cuadro 7 se presentan los resultados del crecimiento de micelio en porcentaje con respecto al testigo de once aislamientos de *B. cinerea* al cumplimiento del primer día de incubación. Éste muestra los tratamientos por columna para cada uno de los aislamientos.

El crecimiento micelial de los aislamientos del hongo muestra que el testigo de los once aislamientos fue superior al resto de los tratamientos en que se utilizaron distintas dosis de fungicida (ver valores del crecimiento de los testigos expresados en diámetro (mm) en anexo 3.1). Fue posible verificar la disminución progresiva del crecimiento del hongo en todos los tratamientos a medida que las cantidades de iprodiona manejadas fueron en aumento.

**CUADRO 7 Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos a seis dosis del fungicida iprodiona ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) más el control (dosis 0 iprodiona) después del primer día de incubación.**

Iprodiona ( $\mu\text{g i.a./mL}$ )	Aislamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0 (T)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
0,05	95,44 a	79,58 b	70,95 b	65,13 b	72,57 b	86,70 a	46,33 b	51,94 b	64,59 b	82,39 a	74,70 b	
0,1	75,44 b	72,56 c	18,13 c	53,99 c	33,77 c	40,09 b	49,47 b	36,64 c	33,37 c	80,22 b	79,21 b	
0,5	40,27 c	58,01 d	17,65 c	52,20 c	21,41 d	22,72 c	44,52 b	15,06 d	27,27 c	56,92 c	40,81 c	
1,0	6,70 d	12,32 e	0,00 d	8,45 d	2,17 e	0,00 d	0,00 c	0,00 e	0,00 d	25,12 d	15,79 d	
5,0	0,00 e	15,40 e	0,00 d	6,51 d	5,40 d e	0,00 d	0,00 c	0,00 e	0,00 d	15,96 e	0,00 e	
10,0	0,00 e	12,26 e	0,00 d	0,00 e	0,00 e	0,00 d	0,00 c	0,00 e	0,00 d	11,56 f	0,00 e	

\* Letras distintas en la columna representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Mann - Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

Iprodiona: fungicida del grupo de las dicarboximidias.

$\mu\text{g i.a./mL}$ : microgramos de ingrediente activo por mL de solución.

Aislamientos: 1 a 11, ver procedencia en Cuadro 3.

Los análisis estadísticos determinaron la presencia de diferencias significativas durante el primer día entre el tratamiento testigo (dosis 0 fungicida) y las concentraciones de iprodiona utilizadas a excepción de los aislamientos 1, 6 y 10 los cuales con la dosis más baja de fungicida se comportaron iguales al testigo.

Los tratamientos con 0,1 y 0,5  $\mu\text{g}$  de fungicida /mL fueron estadísticamente iguales en los aislamientos 3, 4, 7 y 9.

A partir de la concentración de 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de iprodiona los aislamientos 3, 6, 7, 8 y 9 presentaron crecimiento cero.

Los aislamientos 1 y 11 mostraron crecimiento cero desde 5,0  $\mu\text{g}$  de iprodiona /mL., mientras que para los aislamientos 4 y 5 esto mismo ocurrió a partir de 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El aislamiento 2 presentó crecimiento hasta con la concentración más alta de iprodiona (10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) al igual que el aislamiento 10.

Las mediciones del crecimiento micelial promedio de los aislamientos expresadas en porcentaje, efectuadas al segundo día de incubación, se muestran en el Cuadro 8. Éste muestra que el testigo de todos los aislamientos presentó diferencias estadísticas al resto de los tratamientos que incluyeron las dosis de fungicida. Solo el testigo de los aislamientos 2, 3 y 9 fue igual estadísticamente con la dosis más baja de fungicida (0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**CUADRO 8 Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos a seis dosis del fungicida iprodiona ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) más el control (dosis 0 iprodiona) al segundo día de incubación.**

Iprodiona ( $\mu\text{g i.a./mL}$ )	Aislamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0 (T)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
0,05	84,87 b	97,31 a	95,71 a	92,03 b	73,96 b	68,94 b	78,64 b	83,85 b	108,47 a	77,96 b	94,43 b	
0,1	73,51 c	82,32 b	53,71 b	75,15 c	67,03 b	48,28 c	78,61 b	72,46 c	71,27 b	89,96 c	78,16 c	
0,5	65,11 c	82,80 b	25,19 c	69,87 d	21,18 c	21,49 d	80,67 b	20,60 d	32,00 c	87,54 c	91,35 b	
1,0	18,77 d	35,33 c	8,99 d	31,63 e	6,78 d	6,99 e	22,49 c	0,00 e	11,10 d	48,32 d	68,51 c	
5,0	0,00 e	17,64 d	0,00 e	8,73 f	0,00 d e	0,00 f	13,02 c	0,00 e	0,00 e	15,29 e	54,83 d	
10,0	0,00 e	13,58 d	0,00 e	0,00 g	0,00 e	0,00 f	5,99 c	0,00 e	0,00 e	9,68 f	26,26 e	

\* Letras distintas en la columna representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Mann - Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

Iprodiona: fungicida del grupo de las dicarboximidias.

$\mu\text{g i.a./mL}$ : microgramos de ingrediente activo por mL de solución.

Aislamientos: 1 a 11, ver procedencia en Cuadro 3.

Los tratamientos con las concentraciones de 0,1 y 0,5  $\mu\text{g/mL}$  resultaron estadísticamente iguales entre sí solamente en los aislamientos 1, 2 y 10.

El aislamiento 5 presentó igualdad estadística entre la dosis más baja de iprodiona y 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el aislamiento 7 se comportó igual entre la dosis inferior utilizada y 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

En el caso del aislamiento 11, los tratamientos que incluyeron 0,05 y 0,5  $\mu\text{g/mL}$  fueron estadísticamente iguales. De igual manera lo fueron los tratamientos con 0,1 y 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . Esto porque el aislamiento mantuvo una disminución de crecimiento desde el testigo hasta 0,1  $\mu\text{g/mL}$  y con la dosis siguiente (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) el aislamiento presentó un crecimiento mayor que el encontrado con la dosis de 0,1  $\mu\text{g/mL}$ .

Con la concentración de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  de iprodiona, el aislamiento 8 fue el único que redujo el crecimiento micelial en forma total.

Con 5,0  $\mu\text{g/mL}$  de fungicida los aislamientos 1, 3, 5, 6 y 9 presentaron crecimiento cero. La misma situación ocurrió para el aislamiento 4 pero a partir de la concentración más alta utilizada (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

Entre la dosis de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  y la dosis más alta de iprodiona (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ), los aislamientos 10 y 11 presentaron diferencias estadísticas significativas. Además éstos no mostraron crecimiento cero con ninguna de las dosis utilizadas.

Los aislamientos 2 y 7 tampoco presentaron reducción total de crecimiento con la concentración más alta (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

En el Cuadro 9 se exhiben los resultados del crecimiento micelial promedio en porcentaje con respecto al testigo de los once aislamientos de *B. cinerea*, expuestos al fungicida iprodiona al tercer día de incubación.

El Cuadro 9 muestra que la mayoría de los tratamientos testigo fueron estadísticamente iguales con la dosis más baja de fungicida, a excepción de los aislamientos 3, 7, 8 y 10. El testigo de los aislamientos 1, 2 y 9 fue igual hasta con la dosis de 0,1 µg/mL de fungicida.

Los tratamientos de 0,05 y 0,1 µg/mL de los aislamientos 3, 5, 6, 7 y 10 fueron estadísticamente iguales.

Al igual que en el segundo día de evaluación, desde la concentración de 1,0 µg/mL el aislamiento 8 es el único que logra crecimiento cero (ver Figura 2). Los aislamientos 1, 3, 5, 6 y 9 presentaron crecimiento a esa concentración el cuál es reducido totalmente con 5,0 µg/mL.

Los aislamientos 4 y 10 presentaron a 10,0 µg/mL crecimiento cero, mientras que los aislamientos 2, 7 y 11 tuvieron crecimiento a esa concentración.

La Figura 3 muestra el crecimiento *in vitro* de los once aislamientos de *B. cinerea* frente a las distintas dosis de iprodiona al tercer día de incubación. Los valores del crecimiento micelial se encuentran expresados en diámetro (mm) y se pueden ver en el anexo 3.3.

**CUADRO 9 Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos a seis dosis del fungicida iprodiona ( $\mu\text{g}$  i.a./mL) más el control (dosis 0 iprodiona) al tercer día de incubación.**

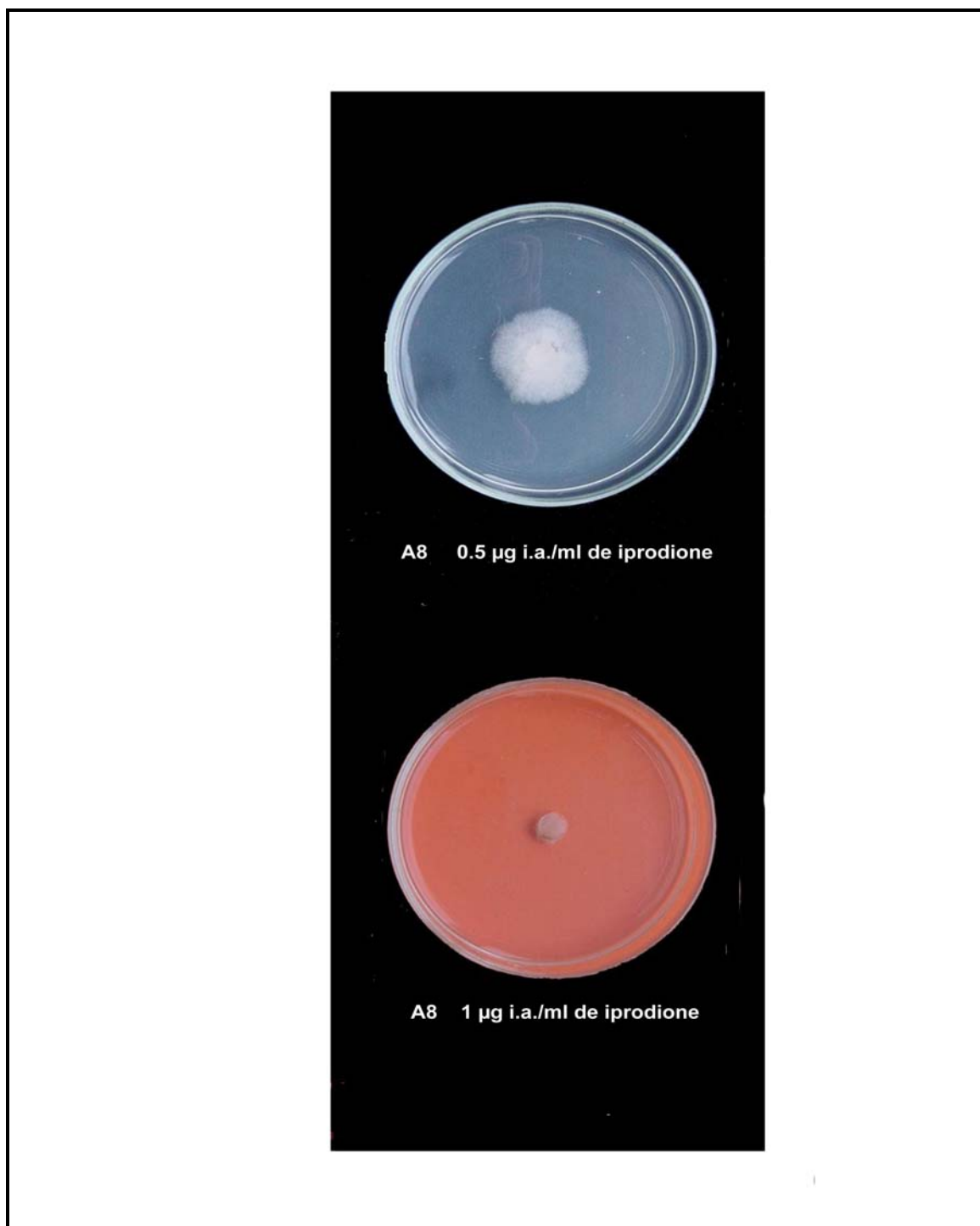
Iprodiona ( $\mu\text{g}$ i.a./mL)	Aislamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0 (T)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
0,05	96,52 a	88,12 a	75,26 b	93,86 a	92,90 a b	96,85 a b	91,18 b	91,12 b	98,65 a	88,67 b	92,41 a	
0,1	91,85 a	83,53 a	65,52 b	85,08 b	83,15 b	86,37 b	87,35 b	75,19 c	79,87 a	85,47 b	78,19 b	
0,5	59,02 b	59,76 b	16,15 c	79,97 b c	15,73 c	25,94 c	83,03 c	14,08 d	17,02 b	65,22 c	57,32 c	
1,0	47,47 b	52,35 c	9,11 d	65,05 c	10,16 d	5,07 d	42,98 d	0,00 e	13,37 c	48,65 d	39,33 d	
5,0	0,00 c	15,02 d	0,00 e	15,02 d	0,00 e	0,00 e	9,75 e	0,00 e	0,00 d	10,43 e	22,16 e	
10,0	0,00 c	9,14 d	0,00 e	0,00 e	0,00 e	0,00 e	6,09 f	0,00 e	0,00 d	0,00 f	11,14 f	

\* Letras distintas en la columna representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Mann - Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

Iprodiona: fungicida del grupo de las dicarboximidias.

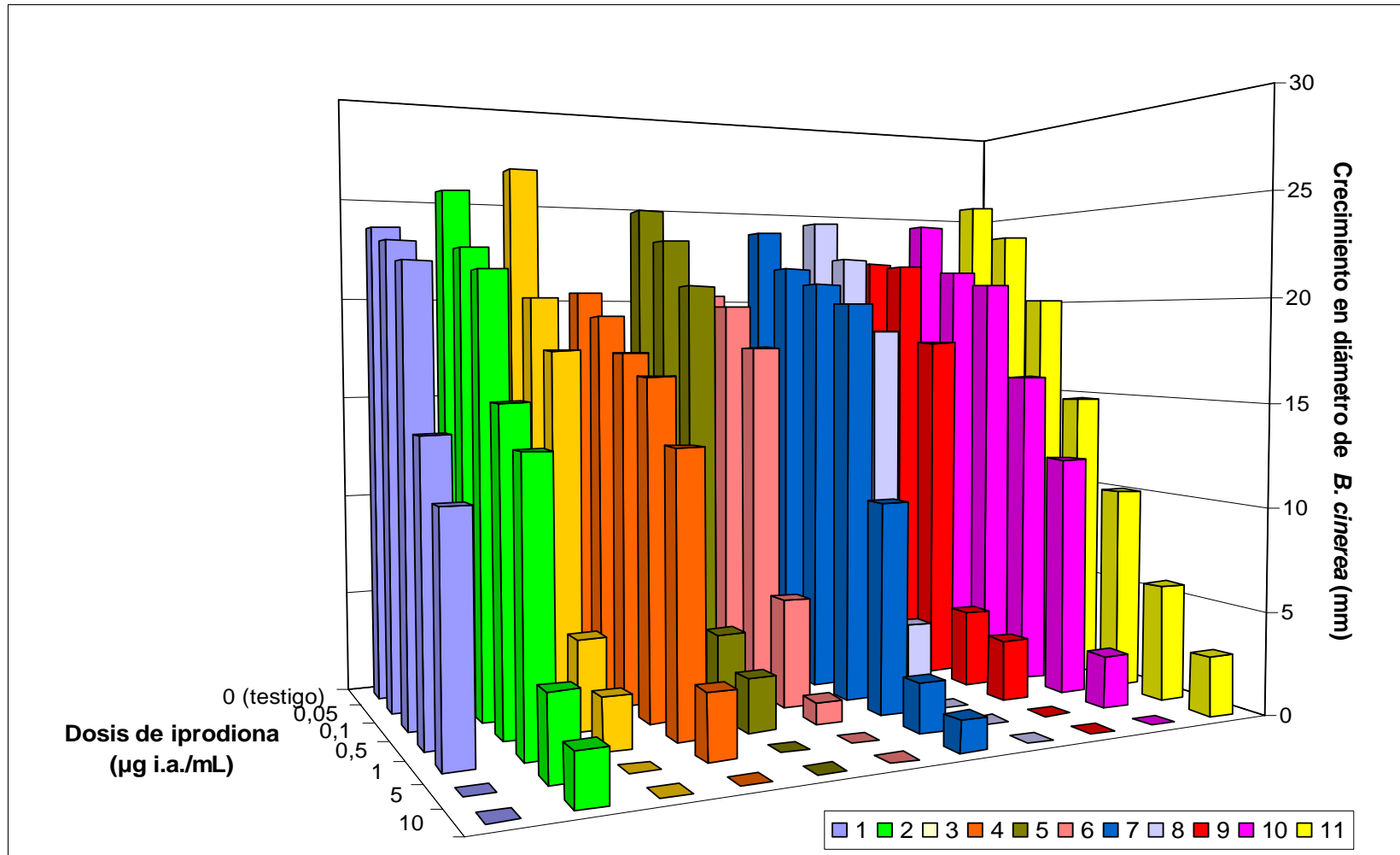
$\mu\text{g}$  i.a./mL: microgramos de ingrediente activo por mL de solución.

Aislamientos: 1 a 11, ver procedencia en Cuadro 3.



**FIGURA 2** Inhibición del crecimiento de micelio del aislamiento 8 (A8) cuando fue expuesto a 0,5 µg i.a./mL y a la dosis de 1,0 µg i.a./mL de iprodiona al tercer día de incubación.





**FIGURA 3** Crecimiento de micelio en diámetro (mm) de once aislamientos de *B. cinerea* provenientes de arándano frente a distintas dosis del fungicida iprodiona al tercer día de incubación.

**4.1.2 Grado de resistencia o sensibilidad de los aislamientos frente al fungicida iprodiona.** A continuación se presentan los resultados de cada aislamiento frente al fungicida iprodiona según el criterio de dosis medianas efectivas ( $ED_{50}$ ) y dosis crítica e inhibición del crecimiento micelial en porcentaje con la concentración de  $10,0 \mu\text{g i.a./mL}$ . Cabe señalar que dicha evaluación se efectuó con los datos obtenidos al tercer día de incubación.

4.1.2.1 Valores  $ED_{50}$ . Los resultados mostraron que todos los aislamientos fueron sensibles al fungicida puesto que los valores de dosis medianas efectivas fluctuaron entre 0,189 y 1,051.

En el Cuadro 10 se presentan los valores de dosis medianas efectivas ( $ED_{50}$ ) de cada aislamiento para al fungicida iprodiona.

**CUADRO 10 Determinación de los valores  $ED_{50}$  ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) de los once aislamientos de *B. cinerea* sometidos a la acción *in vitro* del fungicida iprodiona.**

Aislamiento	$ED_{50}$ (*)
1	0,646
2	0,768
3	0,146
4	1,051
5	0,233
6	0,268
7	0,868
8	0,189
9	0,255
10	0,664
11	0,718

(\*): Valores obtenidos a través de análisis de regresión entre dosis de iprodiona y el porcentaje de inhibición del hongo.

4.1.2.2 Dosis crítica e inhibición micelial. Los resultados señalaron que 8 de los aislamientos son sensibles y corresponden a aquellos en que se obtuvo una inhibición del crecimiento superior al 95 % con la dosis de 10,0 µg/mL. A este grupo corresponden los aislamientos 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10.

En la categoría de resistentes solo se encontraron aislamientos con un bajo nivel de resistencia de acuerdo a LATORRE *et al.*, (1994) correspondiente a los aislamientos 2, 7, y 11. Éstos tuvieron una inhibición de 90,86 %, 93,91% y 88,86 % respectivamente con 10,0 µg/mL.

## **4.2 Benomilo.**

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los aislamientos en relación a su comportamiento frente al fungicida benomilo en el tiempo.

**4.2.1 Crecimiento de *B. cinerea* sobre distintas concentraciones del fungicida benomilo en cada uno de los tres días de incubación.** En el Cuadro 11 se exponen los resultados del crecimiento de micelio con respecto al testigo de los once aislamientos de *B. cinerea* expresados en porcentaje al cumplimiento de primer día de incubación. Cabe señalar que al igual que el fungicida anterior los tratamientos están dados por las distintas concentraciones de fungicida en cada columna.

El Cuadro 11 muestra que los tratamientos control (dosis 0 fungicida) de la mayoría de los aislamientos presentaron diferencias estadísticas significativas respecto de la dosis más baja de fungicida (0,05 µg/mL) a excepción de los aislamientos 1 y 11. Además el testigo del aislamiento 10 fue estadísticamente igual con el tratamiento de 0,5 µg/mL.

**CUADRO 11 Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos a seis dosis del fungicida benomilo ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) más el control (dosis 0 benomilo) después del primer día de incubación.**

Benomilo ( $\mu\text{g i.a./mL}$ )	Aislamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0 (T)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
0,05	92,36 a	79,58 b	77,51 b	75,03 b	71,22 b	66,69 b	68,41 b	74,50 b	94,44 b	102,82 a	83,17 a	
0,1	84,12 b	72,56 c	50,67 c	61,63 c	14,24 c	32,54 c	42,07 c	27,38 c	89,53 b	100,59 a	67,22 b	
0,5	78,41 c	58,01 d	12,34 d	59,60 c	6,71 d	10,78 d	43,06 c	7,20 d	68,96 d	98,71 a	59,90 b	
1,0	67,97 d	12,32 e	7,42 d e	56,41 c	5,28 e	6,20 d	38,96 d	4,67 d	79,84 c	82,45 b	52,09 c	
5,0	63,19 d	15,40 e	5,61 e	52,16 d	0,00 f	0,00 e	31,39 e	0,00 e	68,78 d	79,52 b	44,61 d	
10,0	56,10 e	12,95 e	0,00 f	47,53 e	0,00 f	0,00 e	26,24 f	0,00 e	63,22 d	69,37 c	37,02 d	

\* Letras distintas en la columna representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Mann - Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

Benomilo: fungicida del grupo de los benzimidazoles.

$\mu\text{g i.a./mL}$ : microgramos de ingrediente activo por mL de solución.

Aislamientos: 1 a 11, ver procedencia en Cuadro 3.

Los tratamientos con dosis de 0,1 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  se comportaron iguales para los aislamientos 7 y 11.

Los aislamientos 5, 6 y 8 lograron una supresión total de crecimiento a partir de la dosis crítica indicada para benomilo (5,0  $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que los 8 restantes crecieron incluso con la concentración más alta utilizada (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

Durante el segundo día de evaluación (Cuadro 12) el testigo de los aislamientos 1, 2, 7, 9 y 10 resultó igual estadísticamente respecto de alguna de las concentraciones de fungicida utilizadas: los aislamientos 1 y 10 lo fueron con la dosis más baja de benomilo (0,05  $\mu\text{g/mL}$ ), el 7 hasta con 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , el 2 hasta 0,5  $\mu\text{g/mL}$  y el aislamiento 9 hasta con la concentración de 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . Este último aislamiento (9), presentó un crecimiento superior al testigo en los tratamientos con las dosis de 0,05; 0,5 y 1,0  $\mu\text{g/mL}$  de benomilo.

Con la dosis crítica para benomilo (5,0  $\mu\text{g/mL}$ ) sólo el aislamiento 3 mostró crecimiento cero. Sin embargo, los aislamientos 5, 6 y 8 obtienen el mismo objetivo con 1,0  $\mu\text{g/mL}$ .

El resto de los aislamientos (1, 2, 4, 7, 9, 10 y 11) presentaron crecimiento micelial hasta con la dosis más alta de fungicida utilizada (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

Los datos recolectados a partir del crecimiento *in vitro* evaluados durante el tercer día de incubación (Cuadro 13 y Figura 4), permiten distinguir diferencias en el comportamiento de los aislamientos de *B. cinerea* (ver valores del crecimiento expresados en diámetro (mm) en anexo 4.3).

Los aislamientos 7 y 9 exhibieron igualdad estadística entre el testigo y la dosis de 0,05 para el primero y 1,0  $\mu\text{g/mL}$  de benomilo para el segundo.

**CUADRO 12 Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos a seis dosis del fungicida benomilo ( $\mu\text{g i.a./mL}$ ) más el control (dosis 0 benomilo) al segundo día de incubación.**

Benomilo ( $\mu\text{g i.a./mL}$ )	Aislamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0 (T)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
0,05	93,07 a b	101,88 a	92,24 b	94,24 b	52,78 b	74,90 b	99,07 a	92,74 b	100,27 a	97,28 a b	97,67 b	
0,1	87,33 b	97,31 a	75,05 c	92,95 b	23,82 c	56,72 c	97,65 a	77,59 c	99,57 a	92,02 b c	91,57 b	
0,5	80,59 c	93,69 a	9,87 d	73,21 c	2,49 d	8,05 d	82,44 b	6,32 d	100,22 a	87,98 c d	71,29 c	
1,0	73,64 d	87,97 b	3,68 d e	72,08 c d	0,00 d	0,00 e	70,04 c	0,00 e	100,13 a	85,34 d	47,36 d	
5,0	65,08 e	75,23 c	0,00 e	70,61 d	0,00 d	0,00 e	63,43 c d	0,00 e	91,39 b	80,26 e	39,90 e	
10,0	49,73 f	70,99 c	0,00 e	63,96 e	0,00 d	0,00 e	58,15 d	0,00 e	86,30 c	73,78 f	35,16 f	

\* Letras distintas en la columna representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Mann - Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

Benomilo: fungicida del grupo de los benzimidazoles.

$\mu\text{g i.a./mL}$ : microgramos de ingrediente activo por mL de solución.

Aislamientos: 1 a 11, ver procedencia en Cuadro 3.

**CUADRO 13 Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos a seis dosis del fungicida benomilo ( $\mu\text{g}$  i.a./mL) más el control (dosis 0 benomilo) al tercer día de incubación.**

Benomilo ( $\mu\text{g}$ i.a./mL)	Aislamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0 (T)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
0,05	88,37 b	79,69 b	89,81 b	85,76 b	82,74 b	85,83 b	95,38 a	95,05 b	95,72 a	85,52 b	82,28 b	
0,1	88,41 b	78,59 b	74,81 c	87,73 b	59,40 c	74,85 c	82,98 b	82,89 c	85,41 a	80,07 b	43,22 c	
0,5	87,60 b	77,73 b	6,33 d	88,76 b	0,00 d	3,99 d	79,08 b	0,00 d	89,28 a	72,34 c	41,59 c	
1,0	68,45 c	61,49 c	0,00 d	76,29 c	0,00 d	0,00 d	75,80 b	0,00 d	82,94 a	69,44 c d	44,55 c	
5,0	66,79 c	54,86 c d	0,00 d	70,74 c	0,00 d	0,00 d	66,68 c	0,00 d	60,56 b	60,11 d	46,46 c	
10,0	53,59 d	53,41 d	0,00 d	68,97 c	0,00 d	0,00 d	52,27 d	0,00 d	60,69 b	58,72 d	40,73 c	

\* Letras distintas en la columna representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Mann - Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

Benomilo: fungicida del grupo de los benzimidazoles.

$\mu\text{g}$  i.a./mL: microgramos de ingrediente activo por mL de solución.

Aislamientos: 1 a 11, ver procedencia en Cuadro 3.

En el caso de los aislamientos 1, 2 y 4, éstos fueron estadísticamente iguales entre los tratamientos con las concentraciones de 0,05 a 0,5 µg/mL de fungicida.

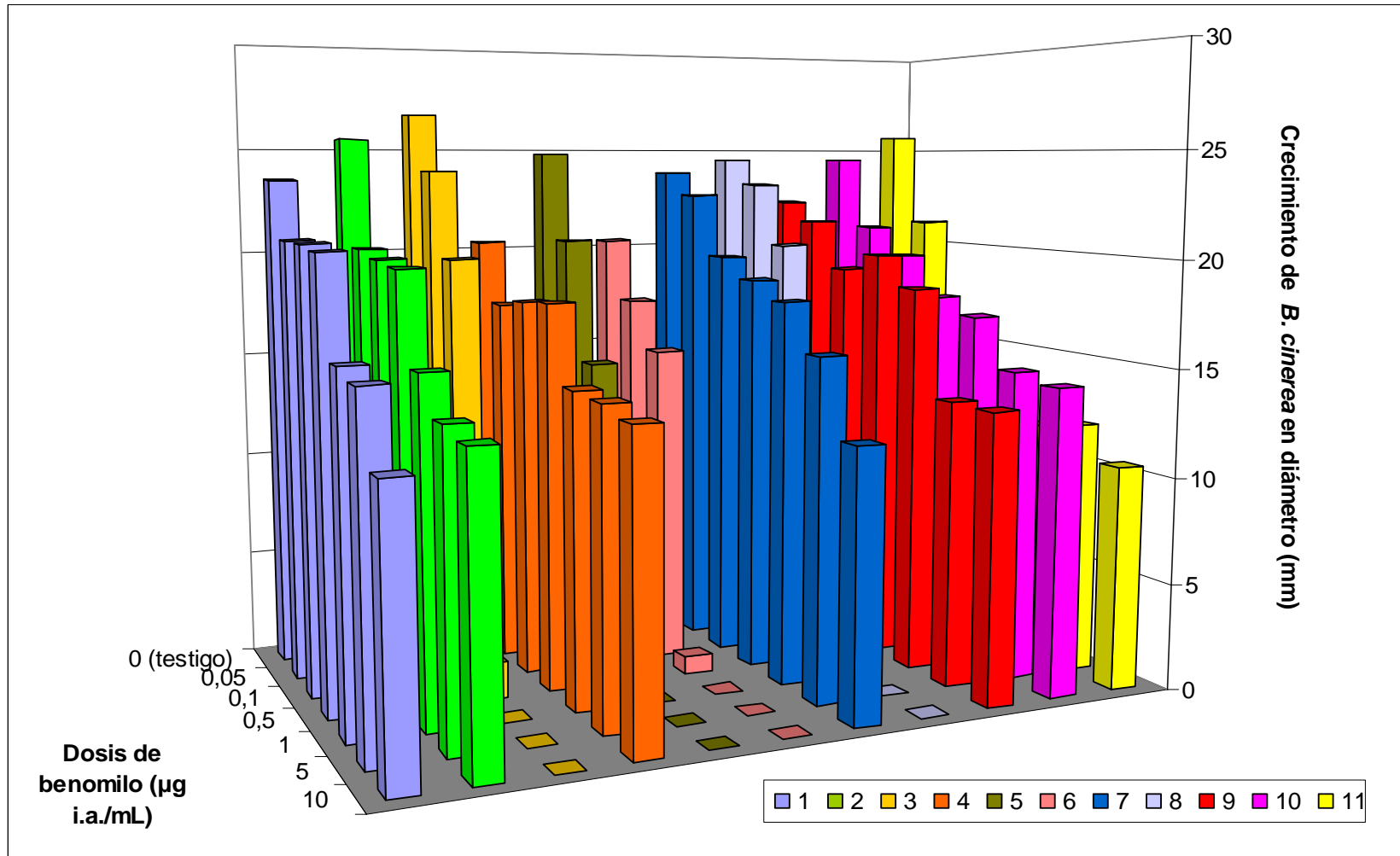
Los aislamientos 5 y 8 presentaron crecimiento cero a partir de 0,5 µg/mL de benomilo mientras que los aislamientos 3 y 6 exhibieron la misma situación desde 1,0 µg/mL de concentración.

Los cuatro aislamientos mencionados en el párrafo anterior (3, 5, 6 y 8) lograron una supresión total de crecimiento con concentraciones menores a la señalada como crítica para benomilo (5,0 µg/mL). Parte de esto se puede visualizar en la Figura 5 la que muestra la inhibición del crecimiento micelial del aislamiento 8 a partir de 0,05 µg/mL hasta la supresión total de crecimiento con 5,0 µg/mL.

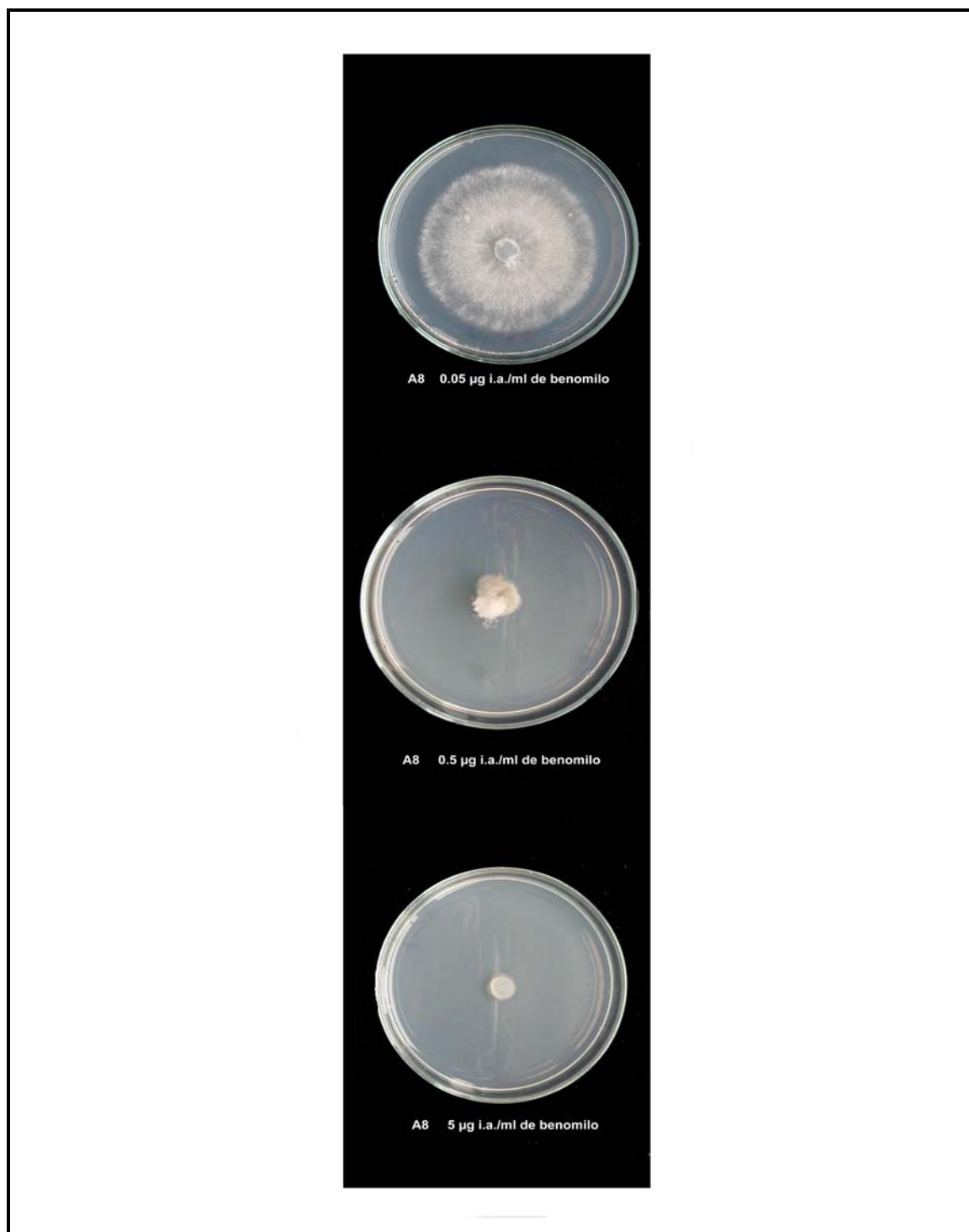
Los cultivos de *B. cinerea* derivados de los aislamientos 1, 2, 4, 7, 9, 10 y 11 no lograron una reducción total de crecimiento en alguna de las dosis de fungicida utilizadas.

**4.2.2 Grado de resistencia o sensibilidad de los aislamientos frente al fungicida benomilo.** A continuación se presentan los resultados de cada aislamiento frente al fungicida benomilo según el criterio de dosis medianas efectivas (ED<sub>50</sub>) y dosis crítica. Cabe señalar que dicha evaluación se efectuó con los datos obtenidos al tercer día de incubación.





**FIGURA 4** Crecimiento de micelio en diámetro (mm) de once aislamientos de *B. cinerea* provenientes de arándano frente a distintas dosis del fungicida benomilo al tercer día de incubación.



**FIGURA 5** Inhibición del crecimiento de micelio del aislamiento 8 (A8) entre las dosis de 0,05 a 5,0 µg i.a./mL de benomilo al tercer día de incubación.

4.2.2.1 Valores ED<sub>50</sub>. En el Cuadro 14 se presentan los valores de dosis medianas efectivas de cada aislamiento expuesto al fungicida benomilo de acuerdo a los datos obtenidos en éste ensayo.

Los resultados evidenciaron que los aislamientos 1, 2, 4, 7, 9 y 10 presentaron valores ED<sub>50</sub> bastante elevados en el rango de 14,485 a 411,340 los que estuvieron en el rango de alta resistencia al producto. También existieron aislamientos sensibles (3, 5, 6, 8 y 11) los que mostraron valores ED<sub>50</sub> de 0,170; 0,121; 0,157; 0,150 y 0,684 respectivamente.

**CUADRO 14 Determinación de los valores ED<sub>50</sub> (µg i.a./mL) de los once aislamientos de *B. cinerea* sometidos a la acción *in vitro* del fungicida benomilo.**

Aislamiento	ED50 (*)
1	22,640
2	14,485
3	0,170
4	411,340
5	0,121
6	0,157
7	18,852
8	0,150
9	27,028
10	31,075
11	0,684

(\*): Valores obtenidos a través de análisis de regresión entre dosis de benomilo y el porcentaje de inhibición del hongo.

4.2.2.2 Dosis crítica. Los resultados mostraron que siete aislamientos (1, 2, 4, 7, 9, 10 y 11) crecieron con la concentración más alta lo que expresó la resistencia de éstos al producto. Los restantes aislamientos fueron inhibidos en su crecimiento a partir de 0,5 µg i.a./mL para los aislamientos 5 y 8 y lo mismo

ocurrió para los aislamientos 3 y 6 a partir de 1,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL. Estos últimos cuatro aislamientos presentaron sensibilidad a benomilo.

### **4.3 Captan.**

A continuación, se exponen los resultados del diámetro de crecimiento promedio relacionados con distintas dosis de captan en el tiempo.

**4.3.1 Crecimiento de *B. cinerea* sobre distintas concentraciones del fungicida captan en cada uno de los tres días de incubación.** Los antecedentes resumidos en el Cuadro 15 muestran el crecimiento micelial con respecto al testigo de los aislamientos de *B. cinerea* expresados en porcentaje durante el primer día de incubación. Al igual que con los dos fungicidas anteriores los tratamientos están dados por las concentraciones de captan en cada columna.

A partir de ello, se pueden inferir los siguientes resultados: durante el primer día se logró verificar que las diferencias entre los testigos y las dosis de captan, fueron marcadas para la mayoría de los aislamientos.

El testigo de los aislamientos 6 y 9 fue estadísticamente igual con la dosis de 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de captan.

En el caso del aislamiento 8, entre las dosis de 0,05 a 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , los tratamientos fueron estadísticamente iguales.

Importante de destacar es que ninguno de los aislamientos logró una supresión total de crecimiento con la dosis más alta utilizada (10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

En el segundo día de evaluación (Cuadro 16), se presentan los resultados del crecimiento micelial en porcentaje para todos los aislamientos de *B. cinerea*.

**CUADRO 15 Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos a seis dosis del fungicida captan ( $\mu\text{g}$  i.a./mL) más el control (dosis 0 captan) después del primer día de incubación.**

Captan ( $\mu\text{g}$ i.a./mL)	Aislamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0 (T)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
0,05	78,79 b	83,29 b	78,42 b	59,72 b	69,67 b	98,39 a	41,56 b	48,63 b	96,41 a	78,81 b	70,24 b	
0,1	74,34 c	71,76 b c	66,47 c	46,01 b c	59,97 b	89,54 a b	40,29 b	37,99 b	93,54 a b	73,47 b c	59,13 c	
0,5	65,93 d	64,46 c	62,19 c d	40,05 c	40,56 c	79,92 b	32,75 c d	34,38 b	76,02 b	65,79 c d	50,66 c d	
1,0	55,93 e	64,00 c	52,61 d e	34,36 d	38,76 c d	62,88 c	33,40 c	30,95 b	73,21 b	57,92 d e	39,93 d	
5,0	36,15 f	36,74 d	49,55 e f	30,50 d	32,30 d	37,57 d	30,67 d	26,44 b	63,58 c	47,01 e f	21,89 e	
10,0	21,48 g	32,00 d	44,71 f	21,27 e	28,78 d	30,21 d	26,34 d	7,04 c	42,17 d	40,61 f	13,26 f	

\* Letras distintas en la columna representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Mann - Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

Captan: fungicida del grupo de las ptalamidas.

$\mu\text{g}$  i.a./mL: microgramos de ingrediente activo por mL de solución.

Aislamientos: 1 a 11, ver procedencia en Cuadro 3.

El Cuadro 16 muestra que todos los aislamientos presentaron diferencias significativas entre el testigo y las dosis de captan. Sin embargo, la reducción de crecimiento aunque evidente no fue absoluta con la mayor concentración de producto utilizado, igual que en lo sucedido en el primer día de evaluación.

Los aislamientos 5 y 6 fueron estadísticamente iguales entre el testigo hasta 0,5 µg/mL de fungicida utilizado. Similar fue lo sucedido para el aislamiento 10, cuyo testigo fue semejante hasta el tratamiento con 0,1 µg/mL.

El aislamiento 9, presentó igualdad estadística entre el tratamiento control hasta la dosis de 5,0 µg/mL de fungicida.

Todos los aislamientos exhibieron elevados crecimientos de micelio, inclusive con la concentración más alta utilizada (10,0 µg/mL).

Durante el último día de evaluación se obtuvieron los registros del crecimiento micelial con respecto al testigo expresados en porcentaje de los once aislamientos de *B. cinerea* presentados en el Cuadro 17 y Figura 6 (ver valores del crecimiento expresados en diámetro (mm) en anexo 5.3).

Al igual que lo ocurrido durante el primer día de evaluación, sólo los aislamientos 6 y 9 mostraron equivalencia a nivel estadístico entre la dosis más baja de fungicida y el testigo. Los demás aislamientos evidenciaron diferencias relacionadas con el tratamiento control y las dosis de captan. Sin embargo, también se detectó paridad entre varias de las distintas concentraciones empleadas, para cada uno de los aislamientos.

En este caso, al igual que el primer y segundo día de evaluación ninguno de los once aislamientos estudiados logró una reducción total de crecimiento con alguna de las dosis de captan evaluadas.

**CUADRO 16 Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos a seis dosis del fungicida captan ( $\mu\text{g}$  i.a./mL) más el control (dosis 0 captan) después del segundo día de incubación.**

Captan ( $\mu\text{g}$ i.a./mL)	Aislamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0 (T)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 b c	100 a	100 a	100 a
0,05	84,07 b	101,22 a	92,10 b	88,05 b	90,34 a	91,62 a b c	84,31 b	105,31 a b	99,54 a	100,39 a	75,76 b	
0,1	67,44 c	84,27 b	86,96 b	88,20 b	89,64 a	97,48 a b	68,36 c	107,08 a	102,27 a	98,21 a	56,64 c	
0,5	62,78 d	79,03 c	79,20 c	86,61 b	88,97 a	94,04 a b	65,56 c	94,47 c d	98,15 a	84,94 b	41,57 c d	
1,0	61,35 d	75,01 c d	78,76 c	82,99 c	73,44 b	80,46 c	62,08 d	84,97 d	93,94 a	80,36 c	41,57 d	
5,0	59,69 d e	73,31 d	70,90 d	66,72 d	60,01 c	58,94 d	49,39 e	65,92 e	93,43 a	76,07 d	34,38 d	
10,0	56,21 e	72,46 e	64,57 d	62,73 d	54,85 c	54,30 d	41,20 f	38,67 f	87,10 b	69,96 e	27,08 d	

\* Letras distintas en la columna representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Mann - Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

Captan: fungicida del grupo de las ptalamidas.

$\mu\text{g}$  i.a./mL: microgramos de ingrediente activo por mL de solución.

Aislamientos: 1 a 11, ver procedencia en Cuadro 3.

**CUADRO 17 Crecimiento porcentual de micelio con respecto al testigo (%) proveniente de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos a seis dosis del fungicida captan ( $\mu\text{g}$  i.a./mL) más el control (dosis 0 captan) después del tercer día de incubación.**

Captan ( $\mu\text{g}$ i.a./mL)	Aislamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
0 (T)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
0,05	87,98 b	84,20 b	89,96 b	78,55 b	88,91 b	93,36 a b	75,80 b	91,94 b	89,69 a b	73,73 b	72,31 b	
0,1	83,40 c	82,51 b	74,70 c	77,91 b	80,52 c	90,26 b	74,50 b c	76,59 c	81,54 b c	69,80 b c	66,71 b	
0,5	69,17 d	74,86 b	65,74 d	75,11 b c	73,35 c	86,37 b	72,69 b c	69,91 c	77,80 b c	67,51 b c d	50,78 c	
1,0	65,65 d	65,02 b	56,37 e	71,18 c	75,12 c	86,37 b	66,39 c	70,28 c	72,99 b	61,01 d	38,01 d	
5,0	56,14 e	40,55 c	35,38 f	64,90 c d	73,47 c	73,72 c	47,69 d	51,17 d	52,54 d	50,20 e	29,36 e	
10,0	42,21 f	33,73 d	34,33 f	53,61 d	67,74 c	43,21 d	38,19 e	37,37 e	42,68 e	40,10 f	27,38 e	

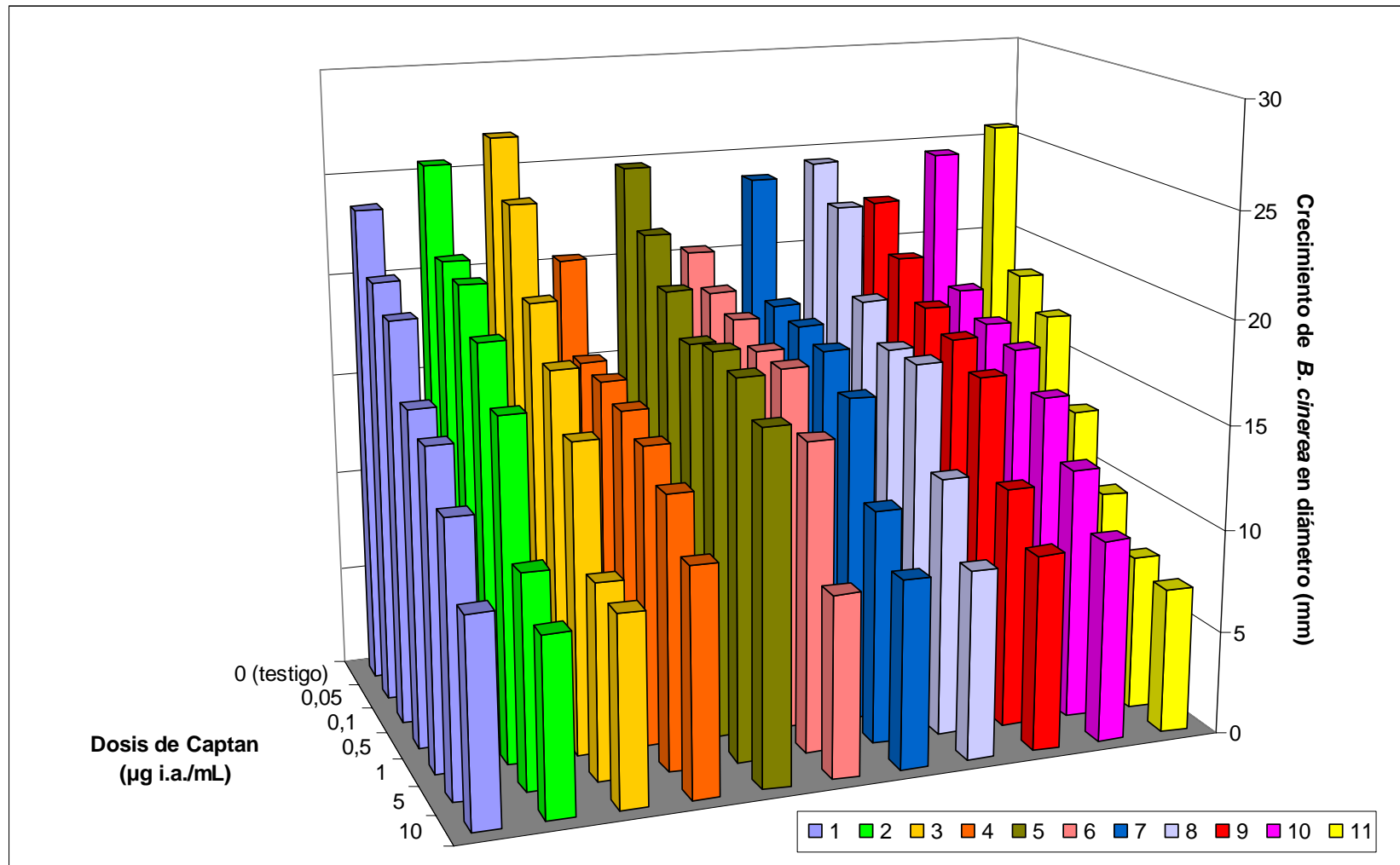
\* Letras distintas en la columna representan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Mann - Whitney ( $P \leq 0,05$ ).

Captan: fungicida del grupo de las ptalamidas.

$\mu\text{g}$  i.a./mL: microgramos de ingrediente activo por mL de solución.

Aislamientos: 1 a 11, ver procedencia en Cuadro 3.





**FIGURA 6** Crecimiento de micelio en diámetro (mm) de once aislamientos de *B. cinerea* provenientes de arándano frente a distintas dosis del fungicida captan al tercer día de incubación.

La Figura 7 muestra la reducción del crecimiento de micelio del aislamiento 8 entre el testigo y la concentración de 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de captan.



**FIGURA 7** Reducción del crecimiento micelial del aislamiento 8 (A8) entre el tratamiento testigo (0 dosis de captan) y 10,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL de captan al tercer día de incubación.

**4.3.2 Grado de resistencia o sensibilidad de los aislamientos frente al fungicida captan.** A continuación se presentan los resultados de cada aislamiento frente al fungicida captan según el criterio de dosis medianas efectivas ( $ED_{50}$ ) y dosis crítica. Cabe señalar que dicha evaluación se efectuó con los datos obtenidos al tercer día de incubación.

4.3.2.1 Valores  $ED_{50}$ . En el Cuadro 18 se presentan los valores de dosis medianas efectivas de cada aislamiento expuesto al fungicida captan de acuerdo a los datos obtenidos en éste ensayo.

Según los valores obtenidos la mayoría de los aislamientos presentaron algún nivel de resistencia a captan. De acuerdo al criterio señalado en el Cuadro 6, los aislamientos 1, 2, 6, 7, 8, 9 y 10 presentaron un bajo nivel de resistencia por obtener valores  $ED_{50}$  entre 2,839 y 6,636. También se encontraron aislamientos con alto nivel de resistencia (4 y 5) con valores  $ED_{50}$  de 58,231; 768,594 respectivamente.

Los aislamientos 3 y 11 fueron sensibles puesto que los valores  $ED_{50}$  fueron 1,830 y 0,526 respectivamente.

**CUADRO 18** Determinación de los valores ED<sub>50</sub> (µg i.a./mL) de los once aislamientos de *B. cinerea* sometidos a la acción *in vitro* del fungicida captan.

Aislamiento	ED50 (*)
1	5,778
2	2,839
3	1,830
4	58,231
5	768,594
6	7,654
7	4,184
8	4,287
9	6,636
10	4,079
11	0,526

(\*): Valores obtenidos a través de análisis de regresión entre dosis de captan y el porcentaje de inhibición del hongo.

4.3.2.2 Dosis crítica. Los resultados mostraron que el crecimiento de micelio de todos los aislamientos de *B. cinerea* expuestos al fungicida se mantuvo incluso con la concentración más alta (10,0 µg/mL) el cual se mantuvo entre un 27,8 % y 67,74%. Según esto los aislamientos presentaron algún nivel de resistencia al fungicida.

## 5 DISCUSION

Los resultados obtenidos en el crecimiento *in vitro* de micelios del hongo *Botrytis cinerea* no pudieron ser evaluados mediante un Análisis de varianza de Fisher (ANDEVA), puesto que el experimento no cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Para ello los resultados fueron sometidos a un análisis de Kruskal-Wallis por rangos y se aplicó la prueba de Mann-Whitney cuando existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos (SIEGEL, 1956).

De los resultados obtenidos de este ensayo, se pueden apreciar diferencias estadísticas significativas para el diámetro de crecimiento de micelio *in vitro*. Esto se estableció para los once aislamientos de *B. cinerea*, frente a distintas dosis de los fungicidas iprodiona, benomilo y captan.

Las posibles causas que expliquen los resultados obtenidos se describen y discuten a continuación, analizando el diámetro de crecimiento *in vitro* con cada uno de los fungicidas en forma separada.

Cabe señalar que la determinación de la condición de sensibilidad o con niveles de resistencia de los aislamientos fue realizada con los datos obtenidos al tercer día de incubación.

### **5.1 Crecimiento micelial *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a seis dosis del fungicida iprodiona más el tratamiento control (0 fungicida) al tercer día de incubación.**

La evaluación del crecimiento micelial de los once aislamientos de *B. cinerea* no se realizó directamente con el criterio de dosis crítica señalado por

Beever y Brien (1983) citados por VASQUEZ (1995). Esto se debió a que aquella concentración (2,0 µg i.a./mL) no se incluyó en la evaluación *in vitro* porque se consideró la concentración de 1,0 µg i.a./mL indicada por trabajos realizados en el extranjero, algunos señalados en el presente estudio. Posteriormente a la evaluación *in vitro* de las distintas dosis determinadas para iprodiona, la información generada en Chile dio cuenta de que la mayoría de los trabajos indican una concentración crítica de 2,0 µg i.a./mL, por lo cual, ésta última fue adoptada para que existiese un punto de comparación asociado a la realidad local.

Con la inhibición de crecimiento micelial a partir de 10,0 µg i.a./mL indicado por LATORRE *et al.*, (1994) se pudo mostrar la existencia de ocho aislamientos sensibles y tres aislamientos con un bajo nivel de resistencia. Los aislamientos con un bajo nivel de resistencia fueron el 2, 7 y 11 los que lograron una inhibición de crecimiento micelial inferior a 95 % con 10,0 µg/mL.

Distintos fueron los resultados entregados por las dosis medianas efectivas (ED<sub>50</sub>) las que revelaron como sensibles a la totalidad de los aislamientos ya que todos presentaron valores menores a 2,0 µg i.a./mL.

Existen otros autores como LA MONDIA y DOUGLAS (1997) y MUÑOZ (1997) quienes consideran como resistente a dicarboximidaz aquellos aislamientos que presenten valores ED<sub>50</sub> mayores a 1,0 µg i.a./mL. De acuerdo a esto el aislamiento 4 fue el único que mostró un ED<sub>50</sub> de 1,051. Esto podría indicar el inicio del desarrollo de resistencia en este aislamiento.

De acuerdo a estos resultados la determinación de niveles de resistencia mediante los valores ED<sub>50</sub> sería lo más indicado ya que se pueden establecer las concentraciones exactas que reducen el crecimiento de los aislamientos a la

mitad. Además, la mayoría de los trabajos relacionados con el estudio de la resistencia han utilizado este medio de evaluación.

Los resultados señalados en este ensayo coinciden con trabajos realizados por ASTORGA (1990), quien obtuvo dosis medianas efectivas ( $ED_{50}$ ) para aislamientos sensibles entre 0,11 y 1,08 mg i.a./L las que se situaron en el rango de valores obtenidos en este ensayo (0,189 y 1,051  $\mu\text{g}$  i.a./mL.). Lo mismo indican LA MONDIA y DOUGLAS (1997) quienes encontraron 29 aislamientos de *B. cinerea* de un total de 45 con valores  $ED_{50}$  menores a 1,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL.

Lo anterior podría estar relacionado a un buen manejo en las áreas de producción, debido a la aplicación limitada de tratamiento químico y a que los aislamientos sensibles presentan una mejor adaptabilidad ecológica (ESPEJO, 1995). Al parecer esto se debería a que los mutantes presentan un reducido vigor, patogenicidad y habilidad competitiva comparadas con las razas sensibles Sisler (1988); Pommer y Lorenz (1982) citados por ALVAREZ (1989). Esta situación también puede estar relacionada a que los aislamientos que presenten algún nivel de resistencia a iprodiona frente a un período de ausencia de aplicaciones de este fungicida, las poblaciones de *B. cinerea pueden* revertir aquella condición. Esto determina que la resistencia a los fungicidas dicarboximidas no es estable en el tiempo (LATORRE *et al.*, 1994).

El riesgo de adquisición de resistencia de este fungicida podría estar relacionado con el modo de acción de las dicarboximidas el cual aunque no se conoce a cabalidad se asocia con varios blancos en las células del hongo (presumiblemente interfiere en la actividad celular, a nivel del ácido desoxirribonucleico o ADN) (SISLER, 1988 y ALVAREZ, 1989).

Otros estudios realizados en Chile han señalado la presencia de aislamientos con bajo nivel de resistencia a iprodiona de *B. cinerea*. En el caso del efectuado por CARREÑO y ALVAREZ (1990) el valor ED<sub>50</sub> promedio de los aislamientos considerados levemente resistentes fue de 2,65 ppm. OCHAGAVIA (1990) también detectó niveles bajos de resistencia a dicarboximidias (ED<sub>50</sub> 0,094 a 1,94 mg i.a./L). Si bien se han encontrado razas o aislamientos resistentes a nivel de laboratorio y campo, existen pocos ejemplos de mermas económicas importantes de los cultivos por causa de la pérdida de sensibilidad a fungicidas de este grupo.

Según LÖCHER (1988) se deben tomar las siguientes estrategias de manejo de resistencia:

- En áreas de producción donde no se han desencadenado problemas de resistencia, el número de tratamientos debería ser limitado a 2 ó 3 por temporada.
- En áreas donde la resistencia a dicarboximidias es prevalente, el número de tratamientos debe ser restringido a dos.
- Para mejorar el control de la enfermedad, la dicarboximida podría ser combinada con otro fungicida antibotritis como thiram, folpet, captan, dichlofluanid, o captan / mancozeb.
- Prácticas culturales que reduzcan la incidencia y severidad de *Botrytis*, usando fertilización balanceada, removiendo el exceso de hojas para mejorar la circulación de aire y la penetración de las aspersiones.



## **5.2 Crecimiento micelial *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a seis dosis del fungicida benomilo más el tratamiento control (0 fungicida) al tercer día de incubación.**

De acuerdo al criterio de dosis crítica para benomilo indicado por Beever y Brien (1983) citados por VASQUEZ (1995) cuatro de los aislamientos (3, 5, 6 y 8) presentaron sensibilidad al producto con la reducción total de crecimiento micelial con 5,0 µg i.a./mL, mientras que el resto de los aislamientos lograron crecimiento micelial incluso con la dosis más alta de benomilo utilizada (10,0 µg i.a./mL).

Al igual que lo ocurrido con el fungicida iprodiona las dosis medianas efectivas mostraron resultados un poco diferentes con respecto al criterio de dosis crítica. Los ED<sub>50</sub> indicaron la existencia de cinco aislamientos sensibles (3, 5, 6, 8 y 11) cuyos valores fluctuaron entre 0,121 y 0,684. Estos incluyeron a cuatro de los aislamientos detectados con el criterio anterior.

Los seis aislamientos restantes (1, 2, 4, 7, 9 y 10) exhibieron un alto nivel de resistencia a benomilo con valores ED<sub>50</sub> de 22,640; 14,485; 411,340; 18,852; 27,028 y 31,075 µg i.a./mL respectivamente.

De igual manera a lo ocurrido con el fungicida dicarboximida los valores ED<sub>50</sub> fueron concluyentes para la determinación de los aislamientos con sensibilidad y alto nivel de resistencia a benomilo.

Los aislamientos resistentes encontrados en este ensayo fueron capaces de crecer entre un 52 a 69 % con 10,0 µg i.a./mL al igual que los encontrados por Ossandón (1981) citado por ALVAREZ (1989), quien aisló razas de *B. cinerea* resistentes a benomilo procedentes de diversos cultivares de uva de mesa y vinífera. Estos crecieron a la misma concentración antes mencionada abarcando toda la superficie que contenía el medio de cultivo más el fungicida.

ALVAREZ (1991), en relación a los valores ED<sub>50</sub>, encontró dosis medianas efectivas de 732,80 ppm en una raza resistente y 0,11 ppm en una sensible. Estas coinciden con las encontradas en los aislamientos sensibles, los cuales no presentaron ED<sub>50</sub> mayores a 1,0. Si bien el valor ED<sub>50</sub> más alto encontrado en el ensayo fue de 411,340 indicaría que este al igual que los aislamientos con dosis medianas efectivas mayores a 10,0 expresan alto nivel de resistencia a benomilo.

Estudios de VASQUEZ (1995) y MONTEALEGRE y VASQUEZ (1996), también determinaron la presencia de cepas de *B. cinerea* altamente resistentes a benomilo cuyos micelios crecieron hasta con 200 ppm i.a.

PEREZ (2004) estudió el comportamiento *in vitro* de aislamientos de *B. cinerea* con el fungicida benomilo. También encontró aislamientos resistentes los cuales crecieron hasta la concentración mas alta de fungicida utilizada (10,0 µg i.a./mL).

Al inicio de la utilización de los fungicidas benzimidazólicos estos reportaron muchos atributos dados por su acción sitio específica que inhibe la polimerización de la tubulina sobre muchos hongos del Phylum Ascomycota Davidse (1973) y Delp (1987) citados por SMITH (1988). Sin embargo, en la actualidad es de conocimiento general los problemas que están acarreado el uso de esta clase de fungicidas.

Van Tuyl (1975), citado por SMITH (1988), reveló que al tratar conidias de diversos hongos con luz ultravioleta, estas producían mutantes resistentes a benomilo. Esto indicaría la proclividad de éstos a manifestar resistencia a benzimidazoles. Como podría ser pronosticado de estos estudios, la resistencia se ha desarrollado en muchos fitopatógenos; sin embargo, el resultado de estas

situaciones varía significativamente dependiendo del patógeno, el cultivo y el fungicida usado.

Los trabajos de VASQUEZ (1995) con *B. cinerea* en postcosecha de peras, muestran la detección de cepas resistentes a benzimidazoles, encontrándose aislamientos capaces de crecer y esporular con concentraciones 4.000 veces mayor que la necesaria para inhibir las cepas sensibles. Por otro lado Montealegre (1991), citado por VASQUEZ (1995), indica que por lo menos un 33 % de las cepas del hongo que producen la cavidad calicinal en peras, son resistentes a las dosis comerciales de benomilo y tiabendazol, limitando el control de este hongo en postcosecha.

A nivel molecular, la resistencia a benzimidazoles está asociada con puntos de mutaciones en los genes de la  $\beta$ - tubulina de varios hongos fitopatógenos. Estos puntos de mutaciones alteran la secuencia de aminoácidos traducidos de la  $\beta$ - tubulina (LUCK y GILLINGS, 1999).

Han sido identificadas tres diferentes mutaciones las cuales corresponden a diferentes niveles de resistencia a benomilo. Estas mutaciones ocurren en el codón 198 (altamente resistentes) y en el codón 200 (moderadamente resistentes) Yarden y Katan (1993), citados por LUCK y GILLINGS (1999).

Parte de lo anterior también fue estudiado por PEREZ (2004), quien detectó a través de técnicas moleculares la sustitución de una adenina por citosina, originando aislamientos altamente resistentes a benomilo. Estas mutaciones concuerdan con aquellos aislamientos que fueron capaces de crecer en medio de cultivo con la concentración más alta de benomilo.

En el caso de *B. cinerea*, la resistencia a benzimidazoles es estable en el tiempo. Esto es el resultado de la habilidad competitiva de los aislamientos resistentes frente a las poblaciones silvestres. Schuerp y Kung (1981), citados por SMITH (1988), compararon aislamientos con niveles de resistencia colectados en 1974, los que se mantuvieron sin aplicaciones de benzimidazoles por 4 años y que al término de ese período mostraron una persistencia de la resistencia entre un 50 a 60 %. Leroux y Clerjeu (1985) citados por SMITH (1988) encontraron poblaciones de *B. cinerea* en el norte de Francia que fueron entre un 50 a 90 % resistentes seis años después de que los fungicidas benzimidazólicos fueran retirados del mercado

### **5.3 Crecimiento micelial *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a seis dosis del fungicida captan más el tratamiento control (0 fungicida) al tercer día de incubación.**

Al igual que lo ocurrido con iprodiona la evaluación de los resultados obtenidos del crecimiento de micelio de los once aislamientos de *B. cinerea* frente al fungicida captan no fue realizada directamente con el criterio de dosis crítica para este fungicida señalado por Beever y Brien (1983) citados por VASQUEZ (1995). Esto se debió a que la concentración (2,0 µg i.a./mL) no se incluyó en la evaluación *in vitro* puesto que al inicio del ensayo este fungicida no sería evaluado, pero posterior a la evaluación de *B. cinerea* con los fungicidas iprodiona y benomilo éste fue utilizado en las mismas concentraciones manejadas para los fungicidas antes mencionados. Sin embargo, la totalidad de los aislamientos mostraron crecimiento micelial entre un 27 a 67 % con la concentración más alta de fungicida (10,0 µg i.a./mL), revelando la pérdida de sensibilidad a captan en algunos de los aislamientos.

Mediante los valores ED<sub>50</sub> se pudo determinar que la mayoría de los aislamientos presentaron resistencia a captan. El grupo con bajo nivel de resistencia reunió a los aislamientos 1, 2, 6, 7, 8, 9 y 10 cuyos valores ED<sub>50</sub> se

encontraron entre 2,0 y 10,0  $\mu\text{g i.a./mL}$ . Los aislamientos 4 y 5 presentaron dosis medianas efectivas bastante mayores que 10,0  $\mu\text{g i.a./mL}$  por lo que los aislamientos fueron considerados altamente resistentes.

También es importante destacar que dos aislamientos (3 y 11) mostraron sensibilidad al fungicida.

El desarrollo de aislamientos resistentes a captan como lo ha mencionado Gómez (1984), citado por VASQUEZ (1995) podría estar relacionado al uso prolongado en el tiempo de este tipo de fungicida. Este determinó distintos niveles de resistencia en aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de parronales de la zona central de Chile los que crecieron hasta con 10 ppm de captan. Trabajos realizados por MONTEALEGRE y VASQUEZ (1996), también señalan la resistencia de aislamientos de *B. cinerea* a captan con crecimiento micelial sobre los 10 ppm.

MARCHANT y PINTO (1999), al estudiar la pudrición calicinal de peras causada por *B. cinerea* y su relación con niveles de resistencia a distintos grupos de fungicidas, pudo establecer una pérdida de sensibilidad para el fungicida captan en todos los aislamientos estudiados.

Considerando los antecedentes descritos es necesario evaluar el uso de mezclas de fungicidas con múltiples sitios de acción, con fungicidas sitio específicos para retardar la aparición de resistencia. Según NORTHOVER y MATTEONI (1986), experimentos en laboratorio y observaciones en terreno validan ésta práctica en algunas situaciones específicas. En algunos casos aplicaciones de benomilo + captan ha incrementado la resistencia de aislamientos hacia ambos fungicidas mientras que captan + iprodiona ha logrado reducir la insensibilidad a iprodiona pero sólo en porciones muy pequeñas. Estas situaciones también dependen entre otros factores de aquellos

tratamientos aplicados en el pasado y la dinámica de utilización de productos químicos.

#### **5.4 Análisis final de los resultados obtenidos con los tres fungicidas evaluados (iprodiona, benomilo y captan) asociados a resistencia.**

A continuación (Cuadro 19), se muestra un resumen señalando la condición de cada aislamiento según los valores ED<sub>50</sub> frente a los tres fungicidas utilizados.

Los antecedentes recogidos y expuestos en el Cuadro 19 mostraron que todos los aislamientos evaluados presentaron sensibilidad a iprodiona. Sin embargo, muchos trabajos realizados en Chile han señalado la presencia de aislamientos resistentes a iprodiona y a otras dicarboximidas, pero sólo en un bajo nivel (CARREÑO y ALVAREZ, 1989; LATORRE, 1989; ASTORGA, 1990; CARREÑO y ALVAREZ, 1990; OCHAGAVIA, 1990; RODRIGUEZ, 1991; LATORRE, 1994; VASQUEZ, 1995; MONTEALEGRE y VASQUEZ, 1996).

En parte esto refleja que la utilización de este fungicida por casi tres décadas aún sigue siendo efectiva para el control de *B. cinerea* posiblemente porque la resistencia de los aislamientos no es estable, ya que al dejar de aplicar el fungicida durante un periodo ellos vuelven a manifestar sensibilidad. Beever (1983) citado por RODRIGUEZ (1991) señala que esto está asociado a la alta sensibilidad osmótica de los aislamientos resistentes a dicarboximidas, lo que sugiere que dicha sensibilidad produce una pérdida en las características propias de los aislamientos y con estas de su virulencia. Sin embargo, Hisada *et al.*, (1981); Katan (1982); Pommer y Lorenz (1982) citados por MUÑOZ *et al.*, (1999) señalan que si bien se han descrito aislamientos resistentes menos "hábiles" que los sensibles, otros aislamientos resistentes, provenientes de campo y laboratorio, han mostrado ser estables y tan "hábiles" como los

sensibles a dicarboximidias. Es claro que estudios bioquímicos y genéticos son necesarios para elucidar el mecanismo de acción de las dicarboximidias.

**CUADRO 19 Resumen de los resultados para cada fungicida según las dosis medianas efectivas (ED<sub>50</sub>).**

Aislamiento	iprodiona	benomilo	captan
1	S	ANR	BNR
2	S	ANR	BNR
3	S	S	S
4	S	ANR	ANR
5	S	S	ANR
6	S	S	BNR
7	S	ANR	BNR
8	S	S	BNR
9	S	ANR	BNR
10	S	ANR	BNR
11	S	S	S

\* S: Sensible, BNR: Bajo nivel de resistencia, ANR: Alto nivel de resistencia.

Los resultados también reflejaron la resistencia múltiple a los fungicidas benomilo y captan exhibidos por la mayoría de los aislamientos evaluados. Posiblemente esta situación se debe al riesgo inherente asociado a estos fungicidas y al riesgo asociado a la enfermedad producida por *B. cinerea*.

En el caso de benomilo existen muchos antecedentes en Chile como en el extranjero acerca del desarrollo de aislamientos resistentes en donde el riesgo asociado al fungicida está dado por el modo de acción sitio específico, la resistencia cruzada entre los fungicidas de su grupo (benzimidazoles), la elevada competitividad que muestran los aislamientos mutantes frente a los sensibles y la baja respuesta asociada a las repetidas aplicaciones del fungicida

(ALVAREZ, 1989; AUGER, 1989; BESOAIN, 1989). Por otro lado *B. cinerea* presenta un ciclo de vida corto, con abundante esporulación si las condiciones son las adecuadas.

Si bien se han encontrado numerosos casos de resistencia en Chile a captan (Gómez (1984) citado por VASQUEZ, 1995; MONTELAEGRE y VASQUEZ, 1996; MARCHANT y PINTO, 1999) esto se debería a un problema de falla de control más que al riesgo inherente asociado al fungicida ya que este actúa inhibiendo varios procesos bioquímicos en muchos sitios por lo que el riesgo de resistencia es muy bajo SISLER Y RAGSDALE (1981).

También se debe tomar en cuenta el riesgo inherente que representa *B. cinerea*. Básicamente este se debe a que las condiciones climáticas necesarias para su desarrollo (clima templado húmedo: temperaturas óptimas de desarrollo entre 18 a 22 ° C, pudiendo tener actividad con temperaturas más bajas y humedad relativa alta) se manifiestan en muchas zonas de Chile, lo que permite la abundante esporulación del hongo y el desarrollo de un ciclo de vida corto.

Existen también otras causas asociadas al fenómeno de la resistencia como lo son el alto número de aplicaciones por temporada y la extensión de las áreas tratadas con los fungicidas. En muchos casos documentados (AUGER, 1989; CARREÑO y ALVAREZ, 1990; LATORRE *et al.*, 1994) esto se puede relacionar a la actividad agrícola intensiva en el uso de fungicidas en muchas zonas de Chile sobre todo en viñas y frutales dirigidos principalmente al mercado externo.

WADE (1988), señala la necesidad de un cambio en el criterio agronómico de utilización de fungicidas, basados en:



- Comenzar estrategias antiresistencia de manera temprana antes de que la resistencia llegue a ser un problema.
- Estrategias basadas tomando en consideración todos los factores relevantes a la situación de empleo, no solamente a aquellos relacionados con el producto (riesgos del fungicida y riesgo del patógeno).
- Reducir al mínimo la presión de selección sobre el patógeno por el fungicida empleando una combinación de métodos (químicos, culturales, biológicos).

## 6 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y bajo las condiciones en que se realizaron los experimentos se puede concluir lo siguiente:

Se confirma la hipótesis de esta investigación en el sentido de que los aislamientos de *B. cinerea*, obtenidos desde plantaciones de arándano (*V. corymbosum* y *V. ashei*), ubicadas entre la V y IX Región presentan niveles de resistencia a los fungicidas aplicados corrientemente en Chile para su control.

La presencia de resistencia fue independiente a la provincia geográfica del aislamiento.

Los aislamientos de *B. cinerea* generaron un nivel de resistencia mayor a benomilo y captan respecto de iprodiona.

El ensayo *in vitro* determinó que todos los aislamientos de *B. cinerea* frente a las distintas dosis del fungicida iprodiona fueron sensibles, con valores ED<sub>50</sub> entre 0,146 y 1,051 µg i.a./mL.

La evaluación de los aislamientos de *B. cinerea in vitro* frente al fungicida benomilo señaló que cinco aislamientos presentaron sensibilidad al fungicida mientras que los seis restantes (1, 2, 4, 7, 9 y 10) mostraron un alto nivel de resistencia. El aislamiento 4 presentó el ED<sub>50</sub> más alto (411, 340 µg i.a./mL.) mientras que los cinco restantes presentaron con dosis medianas efectivas entre 14,485 y 31,075 µg i.a./mL.

La evaluación *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* expuestos al fungicida captan determinó la presencia de aislamientos sensibles (3 y 11) con valores ED<sub>50</sub> menores a 2,0 µg i.a./mL. Los aislamientos 1, 2, 7, 8, 9 y 10 mostraron un bajo nivel de resistencia cuyas dosis medianas efectivas fluctuaron entre 2,839 y 6,636 µg i.a./mL. Los aislamientos 4 y 6 presentaron alto nivel de resistencia al igual que el aislamiento 5 cuyo ED<sub>50</sub> fue el más alto (768,594 µg i.a./mL).

Se determinó la presencia de aislamientos con resistencia múltiple a los fungicidas benomilo y captan en seis de los aislamientos.

## 7 RESUMEN

Se evaluó el grado de resistencia a tres fungicidas (iprodiona, benomilo y captan) en 11 aislamientos de *Botrytis cinerea* aislados desde huertos de arándano ubicados en distintas localidades de Chile (V a IX Región). El ensayo fue realizado *in vitro*, para lo cual se utilizaron seis concentraciones de cada uno de los compuestos más el respectivo control sin fungicida (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 y 10,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL de medio). Los tratamientos fueron evaluados durante tres días (a las 24, 48 y 72 h), tomando una medición del crecimiento de micelio por día en ángulo recto. Todos los tratamientos testigos (0 fungicida) y con fungicidas tuvieron 4 repeticiones.

Se establecieron las dosis medianas efectivas ( $\text{ED}_{50}$ ) de los aislamientos mediante una regresión lineal con el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del tercer día de incubación para cada fungicida. Los resultados mostraron aislamientos sensibles y con niveles de resistencia a iprodiona, benomilo y captan.

En el caso de iprodiona, todos los aislamientos resultaron sensibles con valores  $\text{ED}_{50}$  menores a 2,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL.

En cuanto a benomilo, cinco de los aislamientos fueron sensibles ( $\text{ED}_{50}$  menores a 5,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL). Los aislamientos 1, 2, 4, 7, 9 y 10 mostraron un alto nivel de resistencia con valores  $\text{ED}_{50}$  entre 14,485 y 411,340. Todos los aislamientos resistentes mostraron crecimiento micelial hasta la concentración más alta utilizada (10,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL).

Con captan, los aislamientos 3 y 11 resultaron sensibles. Los aislamientos 1, 2, 7, 8, 9 y 10 presentaron un bajo nivel de resistencia con dosis medianas efectivas entre 2,839 y 6,636. Los tres aislamientos 4, 5 y 6 mostraron valores  $ED_{50}$  mas altos que 10,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL, por lo que fueron considerados altamente resistentes a captan.

Se pudo establecer que la mayoría de los aislamientos presentaron resistencia múltiple a los fungicidas benomilo y captan y que los aislamientos 3 y 11 presentaron sensibilidad a los tres fungicidas involucrados en el ensayo.

## 8 SUMMARY

The level of resistance to three fungicides (iprodione, benomyl and captan) in eleven strains isolated from orchards of blueberries located in different localities from Chile was determined. Six different concentrations of each one of the compounds plus a control without fungicide (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5,0 y 10,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL of PDA) were evaluated for mycelium growth during three days (at 24, 48 and 72 hours). All the treatments, control (0 fungicide) and with fungicides included 4 repetitions.

By means of linear regression with the percentage of mycelial growth inhibition for every fungicide it was established the effective concentration for the 50 % reduction of mycelial growth. Results indicated sensitive isolates and with levels of resistance to iprodione, benomyl and captan

In the iprodione case, all the isolates turned out to be sensitive with  $\text{ED}_{50}$  values minor to 2,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL.

For benomyl, five of the isolates were sensitive ( $\text{ED}_{50}$  minors to 5,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL). The 1, 2, 4, 7, 9 and 10 isolates showed a high level of resistance with  $\text{ED}_{50}$  values among 14,485 and 411,340. All the resistant isolates showed growth mycelial up to the highest concentration used (10,0  $\mu\text{g}$  i.a./mL).

With captan, the isolates 3 and 11 turned out to be sensitive. A low level of resistance with effective doses medium among 2,839 and 6,636 presented the 1, 2, 7, 8, 9 and 10 isolates.

The 4, 5 and 6 isolates showed values  $ED_{50}$  highest than 10,0  $\mu\text{g i.a./mL}$ , by what they were considered to be highly resistant to captan.

It was possible to establish that the majority of the isolates presented multiple resistance to the fungicides benomyl and they captan and that 3 and 11 isolates presented sensibility to three fungicides involved in the research.

## 9 BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. 2ª ed. México. Limusa. 838 p.
- AGURTO, L.; ESTERIO, M. y AUGER, J. 2000. La resistencia al ión Cobre en bacterias fitopatógenas en Chile. Revista Aconex (Chile) 69: 8-14.
- ALVAREZ, M. 1989. Resistencia a los fungicidas, fundamentos y aspectos prácticos. In: Latorre, B. (ed.). Fungicidas y Nematicidas, avances y aplicabilidad. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. pp: 125-138.
- ALVAREZ, M. 1991. Resistencia cruzada negativa entre los fungicidas benomilo y dietofencarb en aislamientos de *Botrytis cinerea* de vides. Agricultura Técnica (Chile) 51(2): 171-176.
- ALVAREZ, C. 1996. Utilización de la técnica de germinación conidial para determinar el grado de resistencia de distintas cepas de *Botrytis cinerea*, a tres grupos de fungicidas (benzimidazoles, dicarboximidas y dicluofluanidos). Tesis Ing. Agr. Quillota. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 98 p.
- ASTORGA, C. 1990. Sensibilidad de *Botrytis cinerea* a iprodiona. Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 160 p.
- AUGER, J. 1989. La resistencia de *Botrytis cinerea* a los fungicidas del grupo Benzimidazoles. In: Montealegre, J; Sazo, L. y Pérez, C. (eds.). Manejo



de plagas y enfermedades en frutales y uva de mesa. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. pp: 113-118.

BAUER, M. 1984. Fitopatología. México. Futura. 377 p.

BENSCH, E. y GUERRERO, J. 2001. Eficacia de Benomilo + Captan y BC-1000 en el control de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* en arándano alto (*Vaccinium corymbosum*) cv. Bluejay. Agro Sur (Chile) 29(1): 12-19.

BESOAIN, X. 1989. Benzimidazoles. In: Latorre, B. (ed.). Fungicidas y Nematicidas, avances y aplicabilidad. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. pp: 17-28.

BUZETA, A. 1997. Chile: Berries para el 2000. Fundación Chile. 133 p.

CARREÑO, I. y ALVAREZ, M. 1989. Razas resistentes de *Botrytis cinerea* a fungicidas dicarboximidas. Revista Aconex (Chile) 49: 17-20.

CARREÑO, I. y ALVAREZ, M. 1990. Determinación de razas resistentes de *Botrytis cinerea* de vides a fungicidas dicarboximidas. Agricultura Técnica (Chile) 50(3): 298–303.

CIAMPI, L. 2002. Introducción a la Patología Vegetal. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 232 p.

DELCAN, J.; MOYANO, C.; RAPOSO, R. y MELGAREJO, P. 2002. Storage of *Botrytis cinerea* using different methods. Journal of Plant Pathology (Italia) 84(1): 3-9.

- ECKERT, J.W. 1988. Historical development of fungicide resistance in plant pathogens. In: Delp, C.J. (ed.). Fungicide Resistance in North America. St. Paul, Minnesota, U.S.A. APS Press. The American Phytopathological Society. pp: 1-3.
- ESPEJO, R. 1995. Efecto del curado en la maduración y pudrición por *Botrytis cinerea* Pers. en kiwi. Control con iprodiona y determinación de resistencia a benzimidazoles (benomyl, thiabendazole) y dicarboximidas (iprodione, vinclozolin). Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 94 p.
- ESTERIO, M.; AUGER, J. y DROGUETT, A. 2003. Producción de uva orgánica: control integrado de *Botrytis cinerea* Pers. en vides de uva de mesa y vinífera (*Vitis vinifera* L.) en Chile. (On line) In: Objetivos y estado de avance de Proyectos de Investigación. <[http://WWW.uchile.cl/facultadescs\\_agronomicas/sanidadvegetal/proyectosinvestigaciona1.htm](http://WWW.uchile.cl/facultadescs_agronomicas/sanidadvegetal/proyectosinvestigaciona1.htm)> (5 Octubre 2004).
- FORBES, G. 2002. Resistance to fungicides: theory and practice. (On line) In: CIP (Perú). <[http://WWW.cipotato.org/org/gilbs/Pubs/ProcBolivia/English/3\\_Fungicides%20resistance.pdf](http://WWW.cipotato.org/org/gilbs/Pubs/ProcBolivia/English/3_Fungicides%20resistance.pdf)> (9 Octubre 2004).
- GAMEZ, M. 2002. Mercado de Berries. (On line) In: ODEPA. <<http://WWW.odepa.gob.cl/no.../noticiasweb.MostrarNoticias?idp=4&idn=33>> (16 Noviembre 2004).
- GOUOT, J. 1988. Characteristics and population dynamics of *Botrytis cinerea* and other pathogens resistant to dicarboximides. Historical development of fungicide resistance in plant pathogens. In: Delp, C.J. (ed.). Fungicide

Resistance in North America. St. Paul, Minnesota, U.S.A. APS Press. The American Phytopathological Society. pp: 53-57.

GUERRERO, A. 2000. Boletín estadístico comercio exterior silvoagropecuario N° 16. (On line) In: ODEPA. <<http://WWW.odepa.gob.cl/servicios-informacion/ComexTrim/Bol-Trimestral-16.pdf>> (10 Mayo 2004):

GUERRERO, A. 2001. Boletín estadístico comercio exterior silvoagropecuario N° 21. (On line) In: ODEPA. <<http://WWW.odepa.gob.cl/servicios-informacion/ComexTrim/Bol-Trimestral-21.pdf>> (10 Mayo 2004).

KIMURA, M; DE SOUZA, P. y DE CASTRO, H. 2001. Sensibilidad *in vitro* de *B. cinerea* a fungicidas. Ciênc Agrotec (Brasil) 25(5): 1150-1160.

KNIGHT, S. C; ANTHONY, V. M; BRADY, A. M; GREENLAND, A. J; HEANEY, S. P; MURRAY, D. C; POWELL, K. A; SCHULZ, M. A; SPINKS, C. A; WORTHINGTON, P. A. y YOULE, D. 1997. Rationale and Perspectives on the development of fungicides. (On line) In: Annual Review of Phytopathology (U.S.A). <<http://WWW.arjournals.annual/reviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.35.1.349;jsessionid=jXC8bJh1QINe?cookieSet=1&journalCode=phytofull/10.1146/annurev.phyto.35.1.349>> (16 Agosto 2004).

LAMONDIA, J. y DOUGLAS, M. 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. Plant Disease (U.S.A) 81(9): 729-732.

LATORRE, B. 1989. Dicarboximidias: características, usos y limitaciones. In: Latorre, B. (ed.). Fungicidas y Nematicidas, avances y aplicabilidad. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía, pp: 103-112.

- LATORRE, B.; FLORES, V.; SARA, M. y ROCO, A. 1994. Dicarboximide resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grape in Chile: Survey and characterization. *Plant Disease (U.S.A)* 78(10): 990-994.
- LATORRE, B. 1997. El pronóstico de la pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en uva de mesa. In: *Botrytis: nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico de uva de mesa*. pp: 10-13. (Original no consultado) Compendiado en BIBA – INIA (Chile). 2005. N° 22576.
- LEROUX, P. 1996. Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pesticide Science (Inglaterra)* 47(2): 191-197.
- LÖCHER, F. 1988. Strategies to control dicarboximide resistant strains of plant pathogens. In: Delp, C.J. (ed.). *Fungicide Resistance in North America*. St. Paul, Minnesota, U.S.A. APS Press. The American Phytopathological Society. pp: 56-57.
- LORENZ, G. 1988. Dicarboximide fungicides: History of resistance development and monitoring methods. In: Delp, C.J. (ed.). *Fungicide Resistance in North America*. St. Paul, Minnesota, U.S.A. APS Press. The American Phytopathological Society. pp: 45-51.
- LUCK, J. y GILLINS, M. 1999. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycological Research (Inglaterra)* 99(12): 1483-1488.
- MARCHANT, V. y PINTO, O. 1999. Detección precoz de la pudrición calicinal (*Botrytis cinerea*) de peras, su relación con pudriciones en almacenaje refrigerado y niveles de resistencia / sensibilidad del hongo a fungicidas botriticidas (captan, benomilo, iprodiona). Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile.

Universidad de las Americas, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. 103 p.

MEDEL, F. 1988. Arbustos frutales: Potencial agroecológico X Región. *Agro Sur* (Chile) 16(1): 53-60.

MILANCA, J. 2001. Estudio del desarrollo de *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr., en plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), cultivares O'Neal y Patriot, y su relación con algunos factores ambientales. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 82 p.

MONTEALEGRE, J. y VASQUEZ, G. 1996. Resistencia a benzimidazoles, carboximidazoles y dicarboximidazoles en cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de peras. *Fitopatología* (Perú) 31(1): 59-65.

MUÑOZ, G. 1997. Obtención y análisis genético mediante RAPD y AFLP de mutantes de *Botrytis cinerea* resistentes a iprodiona. (On line) In: INIA - CHILE.  
<[http://WWW.inia.cl/biotecnologia/proyectos/platina/FONDECYT\\_3970018.htm](http://WWW.inia.cl/biotecnologia/proyectos/platina/FONDECYT_3970018.htm) (25 Julio 2005).

MUÑOZ, G; HINRICHSEN, P. y ALVAREZ, M. 1999. Variabilidad genética de cepas de *Botrytis cinerea* provenientes de vid y tomate con resistencia a dicarboximidazoles. *Agricultura Técnica* (Chile) 59(1): 1-12.

NEWMAN, J. F. 1978. Pesticides. In: Hill, I. R. y Wright, S. J. L. (eds.). *Pesticide Microbiology*. New York, U.S.A. Academic Press. pp: 1- 5.

- NORTHOVER, J. y MATTEONI, J. 1986. Resistance of *Botrytis cinerea* to benomyl and iprodione in vineyards and greenhouses after exposure to the fungicides alone or mixed with captan. *Plant Disease (U.S.A)* 70(5): 398-402.
- OCHAGAVIA, J. 1990. Resistencia a dicarboximidaz: respuesta de *Botrytis cinerea* a vinclozolina. Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 31 p.
- PEREZ, J. 2004. Detección molecular del alelo de resistencia a benomilo en cepas de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., aisladas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 53 p.
- RAPOSO, R.; COLGAN, R.; DELCAN, J. y MELGAREJO, P. 1995. Application of an automated quantitative method to determine fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease (U.S.A)* 79: 294-296.
- RODRIGUEZ, J. 1991. *Botrytis cinerea*: sensibilidad a vinclozolina y caracterización biológica. Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 54 p.
- ROSALES, B. 2000. Determinación de niveles de resistencia expresados en valores de EC50 de aislamientos de *Botrytis cinerea* al fungicida captan (uva de mesa). Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile. Universidad de las Americas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 59 p.
- SIEGEL, S. 1956. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. Tokio, Japan. Mc Graw-Hill. 312 p.

- SISLER, H. y RAGSDALE, N. 1981. Fungicidas. In: Pimentel, D. (ed.). Handbook of pest management in agriculture. Florida, U.S.A. CRC Press. pp: 17-41.
- SISLER, H. 1988. Dicarboximide fungicides: mechanisms of action and resistance. Historical development of fungicide resistance in plant pathogens. In: Delp, C.J. (ed.). Fungicide Resistance in North America. St. Paul, Minnesota, U.S.A. APS Press. The American Phytopathological Society. pp: 52.
- SMITH, C. 1988. History of benzimidazole use and resistance. Historical development of fungicide resistance in plant pathogens. In: Delp, C.J. (ed.). Fungicide Resistance in North America. St. Paul, Minnesota, U.S.A. APS Press. The American Phytopathological Society. pp: 23-24.
- STRASSBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENK, H. y SCHIMPER, A. 1994. Tratado de Botánica. 8ª ed. Castellana. Barcelona, España. Omega. 1068 p.
- SUDZUKI, F. 2002. Cultivo de frutales menores. Santiago, Chile. Universitaria. 194 p.
- TORRES, A.; ALVAREZ, M. y MORALES, A. 1990. Estados fenológicos susceptibles a *Botrytis cinerea* en Frambueso (*Rubus idaeus*). Inhibición del hongo *in vitro* y determinación de *B. cinerea* endógena en frutos. Agricultura Técnica (Chile) 50(3): 292-297.
- TORTORA, A.; CIAMPI, L. y GONZALEZ, S. 1994. Características culturales y biológicas en cepas de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., aisladas en la IX y X regiones. Agricultura Técnica (Chile) 54(3): 243-51.

- TRIVELLAS, A. 1988. Benzimidazole resistance monitoring techniques and the use of monitoring studies to guide benomyl marketing. In: Delp, C.J. (ed.). Fungicide Resistance in North America. St. Paul, Minnesota, U.S.A. APS Press. The American Phytopathological Society. pp: 28-30.
- VALDES, A. 2000. Comportamiento de fungicidas *in vitro* e *in vivo* hacia aislamientos resistentes a dicarboximidas de *Botrytis cinerea* en vides. Tesis Ing. Ejec. Agrop. Santiago, Chile. Universidad Santo Tomás, Escuela de Ingeniería de Ejecución Agropecuaria. 75 p.
- VASQUEZ, G. 1995. Control de *Botrytis cinerea* Pers. en postcosecha de peras cv. Pacham`s Triumph y determinación de resistencia a fungicidas. Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 90 p.
- WADE, Benzimidazole resistance monitoring techniques and the use of monitoring studies to guide benomyl marketing. In: Delp, C.J. (ed.). Fungicide Resistance in North America. St. Paul, Minnesota, U.S.A. APS Press. The American Phytopathological Society. pp: 28-30.
- WAIN, R. y CARTER, G. 1977. Historical aspects. In: Marsh, R.W. (ed.). Systemic fungicides. 2ª ed. Nueva York, U.S.A. Longman. pp: 6-31.
- WESTWOOD, M. 1982. Fruticultura de zonas templadas. Madrid, España. Mundi Prensa. 461 p.



## **ANEXOS**

**Anexo 1.1. Principales características del fungicida captan.****Captan 80 WP**

INGREDIENTE ACTIVO: captan

NOMBRE QUIMICO: N-(triclorometil)tio)-4-cyclohexeno

GRUPO QUIMICO: Ptalamida

CONCENTRACIÓN Y FORMULACIÓN: 800 g/ kg WP (Polvo mojable)

MODO DE ACCION: Contacto, preventivo

FABRICANTE/FORMULADOR: BASF Chile S.A

REGISTRO S.A.G: N° 2041

TOXICIDAD: Grupo IV Ligeramente tóxico

LD50 producto comercial: dermal 2.000 mg/kg

oral > 6.000 mg/kg

**Anexo 1.2. Principales características del fungicida benomilo.****Polyben 50 WP**

INGREDIENTE ACTIVO: benomilo

NOMBRE QUIMICO: Metil-1-(butilcarbamoil)-benzimidazol-2-ilcarbamato

GRUPO QUIMICO: Benzimidazoles

CONCENTRACIÓN Y FORMULACIÓN: 500 g/ kg WP (Polvo mojable)

MODO DE ACCION: Sistémico; preventivo y curativo

FABRICANTE/FORMULADOR: Anasac

REGISTRO S. A. G: N° 2364

TOXICIDAD: Grupo IV Ligeramente tóxico

LD50 producto comercial: dermal >10.000 mg/kg

oral > 10.000 g/kg

**Anexo 1.3. Principales características del fungicida iprodiona.****Rovral 50 WP**

INGREDIENTE ACTIVO: iprodiona

NOMBRE QUIMICO: 3-(3,5 diclorofenil)-N-isopropil-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamida

GRUPO QUIMICO: Dicarboximidias

CONCENTRACIÓN Y FORMULACIÓN: 500 g/ kg WP (Polvo mojable)

MODO DE ACCION: Contacto, preventivo

FABRICANTE/FORMULADOR: Bayer Crop Science Colombia y Filiales

REGISTRO S.A.G: N° 2059

TOXICIDAD: Grupo IV Ligeramente tóxico

LD50 producto comercial: dermal 2.500 mg/kg

oral 3.500 a 4.000 mg/kg

**Anexo 2. Principales características del medio de cultivo agar papa dextrosa (APD).**

**AGAR PAPA DEXTROSA (Mikrobiologie) MERCK.**

Composición típica (g/lit): Infusión de patata 4,0 (infusión de 200 g patata). D´(+)-glucosa 20,0; agar agar 15,0.

Preparación: disolver 39 g en 1 litro de agua desmineralizada calentando en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor; tratar en la autoclave (15 minutos a 121 ° C). Ph: 5 - 6 ± 0,2 a 25 ° C.

**ANEXO 3.1 Medición del crecimiento en diámetro (mm) *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a distintas dosis del fungicida iprodiona en el primer día de incubación.**

Iprodiona ( $\mu\text{g i.a/ml}$ )	1			2			3			4			5		
	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
0 (Testigo)	28,43	27,93	19,18	27,08	27,85	18,47	32,58	32,02	23,30	35,90	34,18	26,04	33,08	31,39	23,24
	26,78	26,17	17,48	25,76	25,75	16,76	31,88	32,07	22,98	34,80	33,37	25,09	35,66	34,89	26,28
	27,71	27,99	18,85	26,81	27,21	18,01	32,23	30,86	22,55	34,24	34,73	25,49	35,75	34,91	26,33
	26,08	26,48	17,28	25,76	26,02	16,89	32,28	33,43	23,86	35,29	34,84	26,07	29,89	31,84	21,87
0,05	26,55	26,23	17,39	22,83	23,52	14,18	27,46	26,72	18,09	26,10	25,82	16,96	26,59	27,04	17,82
	26,61	25,10	16,86	22,87	23,68	14,28	23,42	24,89	15,16	25,89	25,42	16,66	23,44	24,92	15,18
	26,91	26,86	17,89	23,12	22,90	14,01	25,96	24,39	16,18	25,63	26,56	17,10	28,36	27,29	18,83
	26,46	26,25	17,36	22,40	22,26	13,33	25,60	25,06	16,33	25,29	25,08	16,19	27,48	28,70	19,09
0,1	24,44	23,35	14,90	22,28	21,71	13,00	12,41	12,86	3,64	22,97	22,03	13,50	18,71	18,12	9,42
	22,14	22,91	13,53	22,31	20,20	12,26	13,75	14,08	4,92	22,17	21,51	12,84	18,58	18,93	9,76
	21,35	22,74	13,05	23,91	21,42	13,67	15,03	13,53	5,28	24,21	22,08	14,15	16,00	16,33	7,17
	22,97	21,96	13,47	20,50	21,44	11,97	12,06	11,85	2,96	23,04	24,86	14,95	16,29	15,05	6,67
0,5	17,39	16,09	7,74	19,52	18,99	10,26	12,56	12,13	3,35	23,80	24,62	15,21	13,35	12,50	3,93
	15,33	13,88	5,61	17,81	17,89	8,85	13,88	12,75	4,32	20,95	20,89	11,92	14,10	14,37	5,24
	17,50	17,15	8,33	20,40	19,09	10,75	13,56	11,52	3,54	21,30	21,78	12,54	15,44	14,52	5,98
	16,87	16,40	7,64	22,52	17,17	10,85	13,39	14,92	5,16	22,81	23,07	13,94	14,60	14,99	5,80
1	10,06	9,95	1,01	12,27	11,95	3,11	9,00	9,00	0,00	10,83	11,30	2,07	10,17	9,82	1,00
	9,83	9,89	0,86	10,83	11,00	1,92	9,00	9,00	0,00	11,92	11,47	2,70	9,00	9,00	0,00
	10,01	9,97	0,99	10,72	10,31	1,52	9,00	9,00	0,00	11,57	10,99	2,28	10,83	9,44	1,14
	10,86	11,20	2,03	10,75	11,46	2,11	9,00	9,00	0,00	10,84	10,43	1,64	9,00	9,00	0,00
5	9,00	9,00	0,00	12,11	11,04	2,58	9,00	9,00	0,00	10,12	10,62	1,37	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	11,12	11,87	2,50	9,00	9,00	0,00	12,41	11,18	2,80	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	11,45	10,34	1,90	9,00	9,00	0,00	9,94	10,29	1,12	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	13,15	12,55	3,85	9,00	9,00	0,00	10,46	10,30	1,38	9,00	9,00	0,00
10	9,00	9,00	0,00	10,81	11,28	2,05	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	12,11	12,62	3,37	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	11,64	12,74	3,19	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00

## Continuación Anexo 3.1.

6			7			8			9			10			11		
D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
23.41	25.08	15.25	38.51	39.37	29.94	32.91	32.97	23.94	24.68	25.27	15.98	26.88	26.58	17.73	26.27	24.74	16.51
22.90	23.29	14.10	38.99	38.83	29.91	34.22	34.73	25.48	25.60	27.05	17.33	25.31	28.06	17.69	23.32	24.52	14.92
24.75	24.89	15.82	38.59	37.01	28.80	32.54	32.68	23.61	26.22	25.38	16.80	27.52	26.53	18.03	30.03	30.26	21.15
26.60	24.99	16.80	36.67	38.47	28.57	34.48	32.94	24.71	25.31	26.21	16.76	24.86	22.57	14.72	29.04	29.26	20.15
23.39	20.79	13.09	24.37	23.22	14.80	19.34	20.34	10.84	18.84	19.96	10.40	23.92	24.06	14.99	23.19	24.18	14.69
24.80	23.72	15.26	21.95	22.55	13.25	22.43	22.07	13.25	17.27	18.70	8.99	23.21	22.59	13.90	21.92	22.49	13.21
21.44	20.39	11.92	22.78	22.77	13.78	22.39	21.48	12.94	21.43	21.92	12.68	21.25	20.48	11.87	21.45	21.59	12.52
22.90	21.98	13.44	21.60	21.41	12.51	22.59	22.91	13.75	18.39	17.69	9.04	24.83	23.98	15.41	23.17	22.62	13.90
14.24	14.45	5.35	25.83	24.53	16.18	19.29	18.04	9.67	16.11	16.25	7.18	23.88	24.16	15.02	21.87	21.98	12.93
16.79	16.79	7.79	23.81	23.95	14.88	18.20	18.39	9.30	14.28	14.84	5.56	22.45	22.48	13.47	25.21	24.49	15.85
14.85	15.33	6.09	21.05	21.89	12.47	18.61	17.24	8.93	13.63	12.38	4.01	21.80	24.31	14.06	23.17	22.79	13.98
14.70	14.51	5.61	23.17	23.77	14.47	16.84	17.00	7.92	14.58	14.55	5.57	20.40	21.88	12.14	24.64	23.08	14.86
11.62	11.46	2.54	21.26	23.31	13.29	11.62	11.90	2.76	12.65	13.98	4.32	14.77	17.99	7.38	16.33	15.25	6.79
11.60	11.70	2.65	22.41	20.94	12.68	11.58	11.80	2.69	15.10	13.55	5.33	15.74	19.93	8.84	14.78	16.37	6.58
13.08	12.07	3.58	21.91	22.00	12.96	12.98	12.91	3.95	13.38	14.67	5.03	21.68	21.71	12.70	19.36	19.41	10.39
14.29	14.30	5.30	22.26	22.34	13.30	14.76	13.91	5.34	12.67	12.50	3.59	17.28	20.51	9.90	14.87	15.00	5.94
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	13.33	12.75	4.04	13.46	12.26	3.86
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	13.26	12.54	3.90	10.18	11.47	1.83
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	13.17	12.08	3.63	11.93	11.17	2.55
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	14.29	14.80	5.55	12.42	12.08	3.25
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	12.18	11.60	2.89	9.00	9.00	0.00
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	11.92	11.47	2.70	9.00	9.00	0.00
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	11.57	10.99	2.28	9.00	9.00	0.00
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	11.85	12.19	3.02	9.00	9.00	0.00
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	11.65	11.21	2.43	9.00	9.00	0.00
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	11.25	10.98	2.12	9.00	9.00	0.00
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	10.56	10.90	1.73	9.00	9.00	0.00
9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	9.00	9.00	0.00	10.84	10.33	1.59	9.00	9.00	0.00

**ANEXO 3.2 Medición del crecimiento en diámetro (mm) *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a distintas dosis del fungicida iprodiona en el segundo día de incubación.**

Iprodiona (ug i.a/ml)	1			2			3			4			5		
	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
0 (Testigo)	39,31	40,10	30,71	38,96	38,76	29,86	37,23	38,97	29,10	41,23	42,97	33,10	38,48	41,05	30,77
	41,52	40,98	32,25	36,20	34,21	26,21	37,42	39,57	29,50	40,42	41,57	32,00	37,07	38,93	29,00
	41,23	40,77	32,00	36,47	36,62	27,55	38,16	38,10	29,13	41,16	42,10	32,63	44,47	41,98	34,23
	39,11	39,59	30,35	34,11	33,39	24,75	39,30	38,32	29,81	41,30	42,32	32,81	46,14	47,15	37,65
0,05	37,91	35,85	27,88	38,26	37,65	28,96	36,94	36,71	27,83	38,54	37,92	29,23	32,16	31,51	22,84
	35,00	36,58	26,79	33,91	33,19	24,55	35,21	35,82	26,52	39,11	39,43	30,27	35,56	35,77	26,67
	34,78	34,88	25,83	34,00	36,01	26,01	37,63	37,83	28,73	38,76	39,35	30,06	33,33	33,02	24,18
	35,42	34,30	25,86	32,54	37,33	25,94	39,11	37,68	29,40	39,43	39,72	30,58	33,10	32,26	23,68
0,10	30,82	31,68	22,25	29,31	29,72	20,52	23,94	24,91	15,43	33,62	34,75	25,19	31,83	30,16	22,00
	30,02	30,41	21,22	31,68	30,79	22,24	26,18	26,74	17,46	33,30	33,42	24,36	33,73	32,37	24,05
	32,87	31,58	23,23	32,35	32,87	23,61	25,37	22,86	15,12	32,69	32,99	23,84	30,96	28,85	20,91
	34,64	34,22	25,43	31,85	31,81	22,83	24,14	24,13	15,14	33,86	33,55	24,71	30,41	30,13	21,27
0,50	30,49	29,42	20,96	32,16	32,65	23,41	15,62	15,77	6,70	31,29	31,99	22,64	16,01	15,62	6,82
	28,65	23,89	17,27	31,88	31,89	22,89	16,52	16,80	7,66	32,02	32,35	23,19	16,13	16,17	7,15
	30,90	30,57	21,74	30,85	30,04	21,45	15,87	16,27	7,07	32,31	31,77	23,04	16,35	15,75	7,05
	30,63	30,65	21,64	31,53	30,46	22,00	17,24	17,08	8,16	31,43	31,21	22,32	16,06	15,63	6,85
1	15,68	15,03	6,36	17,86	16,61	8,24	10,36	11,06	1,71	20,50	18,85	10,68	11,08	11,02	2,05
	13,64	13,91	4,78	18,58	18,78	9,68	11,18	12,47	2,83	18,81	18,09	9,45	10,53	10,87	1,70
	14,07	14,87	5,47	20,56	18,97	10,77	12,43	13,38	3,91	19,52	20,99	11,26	12,15	11,70	2,93
	16,40	15,46	6,93	18,73	18,44	9,59	11,07	11,13	2,10	19,13	18,68	9,91	10,93	11,56	2,25
5	9,00	10,12	0,56	13,55	14,14	4,85	9,00	9,00	0,00	12,61	13,85	4,23	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	12,58	14,35	4,47	9,00	9,00	0,00	11,53	11,42	2,48	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	13,25	11,76	3,51	9,00	9,00	0,00	10,01	11,83	1,92	9,00	9,00	0,00
	11,75	10,40	2,08	14,52	16,11	6,32	9,00	9,00	0,00	11,60	11,91	2,76	9,00	9,00	0,00
10	9,00	10,29	0,65	12,27	14,27	4,27	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00
	10,45	9,00	0,73	11,46	10,83	2,15	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00
	11,27	9,00	1,14	12,05	12,28	3,17	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	14,03	14,23	5,13	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00



## Continuación Anexo 3.2.

6			7			8			9			10			11		
D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
39,03	40,10	30,57	40,16	39,24	30,70	37,87	37,50	28,69	31,46	29,97	20,97	36,32	37,81	28,81	35,80	34,49	25,49
38,97	39,73	30,35	40,08	40,57	31,33	36,78	35,69	27,24	32,09	32,33	23,33	38,62	37,75	28,75	35,78	34,62	25,62
38,09	39,05	29,57	39,68	39,35	30,52	36,29	36,92	27,61	29,08	29,18	20,18	36,47	35,98	26,98	34,58	35,28	26,28
38,45	40,14	30,30	40,36	40,87	31,62	36,58	35,76	27,17	30,62	31,01	22,01	36,74	36,28	27,28	34,94	34,55	25,55
30,32	29,83	21,08	34,88	35,02	25,95	32,83	33,55	24,19	34,03	33,06	24,55	34,12	31,30	23,71	33,92	33,73	24,83
29,55	30,15	20,85	33,13	32,79	23,96	32,39	33,21	23,80	33,04	33,50	24,27	33,91	29,91	22,91	34,45	34,91	25,68
29,99	29,76	20,88	32,49	32,67	23,58	30,58	31,84	22,21	31,29	31,78	22,54	27,69	29,11	19,40	33,68	33,57	24,63
30,41	28,57	20,49	33,10	33,16	24,13	31,85	31,31	22,58	32,58	31,23	22,91	30,81	29,81	21,31	32,01	32,17	23,09
22,92	22,49	13,71	32,22	32,73	23,48	28,18	28,87	19,53	25,52	25,16	16,34	33,74	33,26	24,50	29,71	30,31	21,01
24,05	24,25	15,15	32,97	33,60	24,29	28,38	29,21	19,80	23,48	24,13	14,81	35,77	35,59	26,68	31,19	30,46	21,83
24,33	23,32	14,83	32,58	33,55	24,07	29,54	30,58	21,06	23,96	24,17	15,07	33,81	34,41	25,11	29,52	31,40	21,46
24,66	22,61	14,64	34,06	35,46	25,76	28,37	29,30	19,84	24,05	25,33	15,69	33,81	33,15	24,48	25,17	26,85	17,01
15,23	15,48	6,36	33,76	34,52	25,14	13,67	13,08	4,38	16,06	15,92	6,99	33,14	34,72	24,93	32,59	33,76	24,18
15,41	15,66	6,54	33,99	34,53	25,26	14,80	13,85	5,33	17,08	16,00	7,54	33,20	33,47	24,34	32,58	33,21	23,90
16,17	15,11	6,64	33,13	33,80	24,47	15,63	15,65	6,64	15,48	15,78	6,63	33,24	33,08	24,16	30,89	31,33	22,11
15,52	15,31	6,42	34,51	34,04	25,28	15,88	15,05	6,47	15,63	15,68	6,66	33,50	33,71	24,61	34,37	33,37	24,87
11,10	12,36	2,73	15,50	16,50	7,00	9,00	9,00	0,00	11,15	11,45	2,30	21,89	22,20	13,05	27,16	27,19	18,18
11,04	10,45	1,75	14,90	15,85	6,38	9,00	9,00	0,00	12,52	11,47	3,00	22,36	22,90	13,63	26,98	26,54	17,76
10,35	10,89	1,62	15,85	15,17	6,51	9,00	9,00	0,00	10,97	10,66	1,82	21,88	22,66	13,27	25,93	25,98	16,96
11,56	11,13	2,35	17,33	16,74	8,04	9,00	9,00	0,00	11,87	11,17	2,52	22,67	23,65	14,16	24,94	29,86	18,40
9,00	9,00	0,00	13,49	13,47	4,48	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	13,33	12,75	4,04	23,09	22,79	13,94
9,00	9,00	0,00	13,10	13,83	4,47	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	13,26	12,54	3,90	23,15	23,44	14,30
9,00	9,00	0,00	11,50	13,00	3,25	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	13,17	12,08	3,63	24,15	22,71	14,43
9,00	9,00	0,00	12,84	13,11	3,98	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	14,29	14,80	5,55	23,06	23,67	14,37
9,00	9,00	0,00	10,40	10,71	1,56	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	11,86	12,91	3,39	16,54	17,08	7,81
9,00	9,00	0,00	10,83	10,47	1,65	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	12,09	11,97	3,03	15,82	15,77	6,80
9,00	9,00	0,00	12,26	12,26	3,26	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	10,39	10,75	1,57	16,01	15,99	7,00
9,00	9,00	0,00	10,23	9,74	0,99	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	10,59	13,14	2,87	14,82	14,63	5,73

**ANEXO 3.3 Medición del crecimiento en diámetro (mm) *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a distintas dosis del fungicida iprodiona en el tercer día de incubación.**

Iprodiona (ug i.a/ml)	1			2			3			4			5		
	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
0 (Testigo)	33,14	32,55	23,85	32,05	33,70	23,88	35,68	34,86	26,27	27,93	28,26	19,10	31,85	33,53	23,69
	31,95	32,61	23,28	35,34	34,21	25,78	35,73	35,98	26,86	30,47	30,19	21,33	34,64	33,77	25,21
	32,08	31,94	23,01	34,90	33,58	25,24	36,42	36,12	27,27	29,00	29,93	20,47	34,49	34,81	25,65
	32,20	33,95	24,08	35,92	36,26	27,09	35,14	35,54	26,34	29,76	29,44	20,60	35,31	32,00	24,66
0,05	30,01	29,94	20,98	33,29	31,97	23,63	30,29	36,25	24,27	27,56	27,72	18,64	35,54	33,59	25,57
	32,47	31,90	23,19	30,55	31,71	22,13	25,05	28,17	17,61	27,90	28,14	19,02	30,54	30,23	21,39
	33,05	33,76	24,41	31,91	30,46	22,19	25,64	26,53	17,09	27,34	29,56	19,45	31,23	33,22	23,23
	31,90	30,82	22,36	31,02	30,81	21,92	30,25	30,42	21,34	28,42	28,31	19,37	31,27	30,73	22,00
0,10	30,33	30,95	21,64	24,02	23,47	14,75	24,81	26,15	16,48	27,89	27,54	18,72	27,91	28,25	19,08
	29,68	29,72	20,70	24,53	34,52	20,53	26,17	26,37	17,27	27,51	27,24	18,38	27,06	29,42	19,24
	29,82	29,80	20,81	34,45	33,45	24,95	25,99	23,91	15,95	25,38	25,98	16,68	29,75	30,40	21,08
	31,79	32,97	23,38	33,67	34,30	24,99	29,66	28,77	20,22	24,07	25,00	15,54	31,90	32,27	23,09
0,50	22,63	22,62	13,63	23,73	23,73	14,73	13,93	13,17	4,55	24,64	26,00	16,32	13,69	12,21	3,95
	22,81	19,10	11,96	24,56	23,97	15,27	13,43	13,86	4,65	25,14	25,39	16,27	12,58	12,69	3,64
	23,23	23,97	14,60	24,18	24,99	15,59	13,04	12,81	3,93	22,33	24,19	14,26	13,10	12,85	3,98
	25,75	23,05	15,40	23,71	25,02	15,37	13,07	13,13	4,10	27,51	27,09	18,30	13,48	12,58	4,03
1	21,04	20,97	12,01	21,47	20,46	11,97	11,20	11,39	2,30	22,45	24,41	14,43	11,20	10,79	2,00
	19,84	18,95	10,40	24,16	22,99	14,58	11,09	12,68	2,89	22,08	21,11	12,60	11,82	11,17	2,50
	18,31	19,62	9,97	23,03	21,13	13,08	11,23	12,06	2,65	21,20	19,83	11,52	12,17	12,32	3,25
	21,48	21,25	12,37	22,63	22,90	13,77	10,45	11,36	1,91	23,08	23,87	14,48	12,15	10,53	2,34
5	9,00	9,00	0,00	11,38	11,87	2,63	9,00	9,00	0,00	10,95	11,67	2,31	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	10,99	12,22	2,61	9,00	9,00	0,00	12,56	10,53	2,55	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	14,16	13,74	4,95	9,00	9,00	0,00	14,01	12,04	4,03	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	14,78	13,53	5,16	9,00	9,00	0,00	12,19	12,56	3,38	9,00	9,00	0,00
10	9,00	9,00	0,00	11,24	10,62	1,93	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	10,39	10,60	1,50	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	11,24	10,90	2,07	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00
	9,00	9,00	0,00	12,25	13,40	3,83	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00

**Continuación Anexo 3.3.**

6			7			8			9			10			11		
D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
28,81	29,72	20,27	31,72	33,00	23,36	33,65	33,56	24,61	34,12	34,74	25,43	31,47	34,51	23,99	34,60	35,50	26,05
28,54	27,99	19,27	34,46	32,57	24,52	33,33	32,83	24,08	32,45	33,12	23,79	33,98	34,54	25,26	32,37	33,36	23,87
28,66	30,49	20,58	32,39	34,89	24,64	33,35	33,46	24,41	27,66	27,43	18,55	31,05	33,69	23,37	33,63	36,44	26,04
31,61	28,75	21,18	34,11	29,25	22,68	32,88	34,40	24,64	29,47	30,68	21,08	33,41	34,84	25,13	34,88	36,64	26,76
28,31	28,88	19,60	30,09	32,49	22,29	33,01	31,76	23,39	30,64	31,72	22,18	27,52	28,85	19,19	32,46	34,89	24,68
27,28	26,91	18,10	29,32	29,65	20,49	28,45	30,41	20,43	32,99	33,32	24,16	31,75	31,72	22,74	32,29	31,98	23,14
30,97	32,11	22,54	30,97	29,09	21,03	30,37	31,68	22,03	29,94	29,50	20,72	30,32	31,64	21,98	30,89	31,68	22,29
27,06	27,90	18,48	32,88	31,07	22,98	32,36	32,05	23,21	29,44	29,75	20,60	30,81	32,71	22,76	33,86	33,78	24,82
27,90	25,83	17,87	30,70	29,99	21,35	27,84	27,19	18,52	24,18	24,36	15,27	28,62	27,81	19,22	28,91	29,93	20,42
26,76	24,69	16,73	29,89	29,61	20,75	27,08	28,38	18,73	26,40	26,48	17,44	32,96	32,14	23,55	27,48	29,87	19,68
25,09	26,02	16,56	30,43	29,65	21,04	27,14	29,15	19,15	27,42	29,61	19,52	29,90	28,84	20,37	28,19	28,87	19,53
29,17	26,91	19,04	29,23	28,78	20,01	27,47	24,69	17,08	27,45	28,03	18,74	29,61	29,26	20,44	29,88	29,54	20,71
15,69	15,65	6,67	28,12	29,25	19,69	12,56	12,18	3,37	11,95	12,53	3,24	25,52	22,52	15,02	24,24	24,83	15,54
13,67	14,67	5,17	29,23	28,50	19,87	13,57	13,40	4,49	12,42	11,98	3,20	25,80	26,26	17,03	24,03	24,60	15,32
13,57	14,28	4,93	30,20	29,25	20,73	13,18	12,04	3,61	13,08	13,13	4,11	25,01	25,25	16,13	23,34	24,27	14,81
13,58	13,05	4,32	28,30	27,20	18,75	11,85	10,76	2,31	14,24	12,93	4,59	24,15	25,03	15,59	22,40	22,07	13,24
9,00	10,98	0,99	18,71	19,08	9,90	9,00	9,00	0,00	11,70	12,12	2,91	21,26	22,28	12,77	18,53	17,86	9,20
9,00	9,00	0,00	19,17	18,05	9,61	9,00	9,00	0,00	11,88	12,19	3,04	15,90	16,74	7,32	19,11	19,17	10,14
10,34	10,28	1,31	19,39	18,88	10,14	9,00	9,00	0,00	12,62	11,81	3,22	22,16	21,92	13,04	20,63	21,13	11,88
10,89	10,77	1,83	20,02	20,50	11,26	9,00	9,00	0,00	11,76	11,69	2,73	23,38	23,44	14,41	18,07	18,33	9,20
9,00	9,00	0,00	11,09	10,91	2,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	11,52	11,88	2,70	15,34	15,88	6,61
9,00	9,00	0,00	11,53	12,10	2,82	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	11,38	11,17	2,28	16,22	17,16	7,69
9,00	9,00	0,00	11,61	10,73	2,17	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	11,76	11,41	2,59	13,88	13,35	4,62
9,00	9,00	0,00	11,59	11,00	2,30	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	11,18	12,12	2,65	12,07	13,65	3,86
9,00	9,00	0,00	9,87	9,93	0,90	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	10,83	11,46	2,15
9,00	9,00	0,00	10,63	10,97	1,80	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	10,56	12,51	2,54
9,00	9,00	0,00	10,15	10,14	1,15	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	12,10	12,04	3,07
9,00	9,00	0,00	11,34	10,55	1,95	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	0,00	12,28	13,09	3,69

**ANEXO 4.1 Medición del crecimiento en diámetro (mm) *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a distintas dosis del fungicida benomilo en el primer día de incubación.**

Benomilo ( $\mu\text{g i.a./ml}$ )	1			2			3			4			5		
	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
0 (Testigo)	28,43	27,93	19,18	27,08	27,85	18,47	32,58	32,02	23,30	35,90	34,18	26,04	33,08	31,39	23,24
	26,78	26,17	17,48	25,76	25,75	16,76	31,88	32,07	22,98	34,80	33,37	25,09	35,66	34,89	26,28
	27,71	27,99	18,85	26,81	27,21	18,01	32,23	30,86	22,55	34,24	34,73	25,49	35,75	34,91	26,33
	26,08	26,48	17,28	25,76	26,02	16,89	32,28	33,43	23,86	35,29	34,84	26,07	29,89	31,84	21,87
0,05	26,97	26,02	17,50	22,83	23,52	14,18	27,46	26,72	16,72	26,10	25,82	19,83	26,59	27,04	16,33
	25,77	24,32	16,05	22,87	23,68	14,28	23,42	24,89	18,25	25,89	25,42	18,71	23,44	24,92	17,33
	25,17	24,74	15,96	23,12	22,90	14,01	25,96	24,39	19,16	25,63	26,56	19,14	28,36	27,29	18,32
	26,89	26,61	17,75	22,40	22,26	13,33	25,60	25,06	17,73	25,29	25,08	19,36	27,48	28,70	17,62
0,10	24,31	23,96	15,14	22,28	21,71	13,00	12,41	12,86	9,85	22,97	22,03	16,23	18,71	18,12	3,44
	24,77	24,11	15,44	22,31	20,20	12,26	13,75	14,08	11,55	22,17	21,51	14,41	18,58	18,93	3,21
	24,05	23,99	15,02	23,91	21,42	13,67	15,03	13,53	11,75	24,21	22,08	16,87	16,00	16,33	3,25
	24,42	24,87	15,65	20,50	21,44	11,97	12,06	11,85	13,81	23,04	24,86	15,76	16,29	15,05	4,03
0,50	23,19	23,56	14,38	19,52	18,99	10,26	12,56	12,13	1,96	23,80	24,62	15,24	13,35	12,50	1,98
	24,68	23,33	15,01	17,81	17,89	8,85	13,88	12,75	2,11	20,95	20,89	14,57	14,10	14,37	1,59
	23,30	21,39	13,35	20,40	19,09	10,75	13,56	11,52	2,91	21,30	21,78	16,00	15,44	14,52	1,44
	23,46	23,26	14,36	22,52	17,17	10,85	13,39	14,92	4,48	22,81	23,07	15,41	14,60	14,99	1,56
1	21,00	20,02	11,51	12,27	11,95	3,11	9,00	9,00	1,33	10,83	11,30	14,39	10,17	9,82	1,18
	20,97	21,02	12,00	10,83	11,00	1,92	9,00	9,00	1,72	11,92	11,47	14,51	9,00	9,00	1,51
	22,06	21,82	12,94	10,72	10,31	1,52	9,00	9,00	1,61	11,57	10,99	14,54	10,83	9,44	1,12
	22,92	21,17	13,05	10,75	11,46	2,11	9,00	9,00	2,23	10,84	10,43	14,50	9,00	9,00	1,35
5	20,45	19,73	11,09	12,11	11,04	2,58	9,00	9,00	1,03	10,12	10,62	14,13	14,55	14,01	0,00
	20,73	20,35	11,54	11,12	11,87	2,50	9,00	9,00	1,25	12,41	11,18	12,51	9,00	9,00	0,00
	21,36	21,36	12,36	11,45	10,34	1,90	9,00	9,00	1,39	9,94	10,29	12,90	9,00	9,00	0,00
	20,04	20,01	11,03	13,15	12,55	3,85	9,00	9,00	1,54	10,46	10,30	14,02	9,00	9,00	0,00
10	19,23	19,07	10,15	10,81	11,28	2,05	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	12,32	9,00	9,00	0,00
	18,75	19,29	10,02	9,38	9,59	0,48	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	12,00	9,00	9,00	0,00
	19,63	19,28	10,46	12,11	12,62	3,37	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	11,94	9,00	9,00	0,00
	18,89	19,55	10,22	11,64	12,74	3,19	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	12,53	9,00	9,00	0,00

**Continuación Anexo 4.1.**

6			7			8			9			10			11		
D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
23,41	25,08	15,25	38,51	39,37	29,94	32,91	32,97	23,94	24,68	25,27	15,98	26,88	26,58	17,73	26,27	24,74	16,51
22,90	23,29	14,10	38,99	38,83	29,91	34,22	34,73	25,48	25,60	27,05	17,33	25,31	28,06	17,69	23,32	24,52	14,92
24,75	24,89	15,82	38,59	37,01	28,80	32,54	32,68	23,61	26,22	25,38	16,80	27,52	26,53	18,03	30,03	30,26	21,15
26,60	24,99	16,80	36,67	38,47	28,57	34,48	32,94	24,71	25,31	26,21	16,76	24,86	22,57	14,72	29,04	29,26	20,15
23,39	20,79	9,85	24,37	23,22	18,76	19,34	20,34	18,53	18,84	19,96	15,48	23,92	24,06	17,79	23,19	24,18	14,52
24,80	23,72	9,58	21,95	22,55	20,62	22,43	22,07	17,92	17,27	18,70	16,32	23,21	22,59	17,66	21,92	22,49	13,69
21,44	20,39	10,44	22,78	22,77	20,98	22,39	21,48	18,88	21,43	21,92	15,84	21,25	20,48	17,48	21,45	21,59	16,61
22,90	21,98	11,46	21,60	21,41	19,85	22,59	22,91	17,47	18,39	17,69	15,55	24,83	23,98	17,18	23,17	22,62	15,67
14,24	14,45	4,75	25,83	24,53	13,15	19,29	18,04	8,16	16,11	16,25	13,84	23,88	24,16	17,11	21,87	21,98	12,98
16,79	16,79	4,84	23,81	23,95	11,72	18,20	18,39	3,86	14,28	14,84	15,67	22,45	22,48	18,03	25,21	24,49	12,22
14,85	15,33	5,71	21,05	21,89	12,46	18,61	17,24	7,27	13,63	12,38	15,56	21,80	24,31	17,52	23,17	22,79	12,16
14,70	14,51	4,85	23,17	23,77	11,99	16,84	17,00	7,46	14,58	14,55	14,83	20,40	21,88	15,92	24,64	23,08	11,51
11,62	11,46	1,71	21,26	23,31	14,27	11,62	11,90	1,73	12,65	13,98	12,97	14,77	17,99	17,32	16,33	15,25	13,20
11,60	11,70	2,47	22,41	20,94	12,53	11,58	11,80	1,44	15,10	13,55	11,15	15,74	19,93	16,76	14,78	16,37	10,39
13,08	12,07	1,36	21,91	22,00	12,06	12,98	12,91	2,12	13,38	14,67	10,63	21,68	21,71	15,38	19,36	19,41	9,89
14,29	14,30	1,14	22,26	22,34	11,64	14,76	13,91	1,76	12,67	12,50	11,37	17,28	20,51	17,84	14,87	15,00	10,08
9,00	9,00	1,70	9,00	9,00	10,97	9,00	9,00	1,65	9,00	9,00	14,08	13,33	12,75	14,31	13,46	12,26	9,44
9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	11,57	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	12,90	13,26	12,54	14,29	10,18	11,47	9,17
9,00	9,00	0,58	9,00	9,00	11,42	9,00	9,00	1,76	9,00	9,00	13,21	13,17	12,08	14,09	11,93	11,17	9,64
9,00	9,00	1,55	9,00	9,00	11,70	9,00	9,00	1,15	9,00	9,00	13,20	14,29	14,80	13,51	12,42	12,08	9,63
9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	9,25	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	10,41	12,18	11,60	14,10	9,00	9,00	7,36
9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	8,68	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	11,31	11,92	11,47	13,30	9,00	9,00	7,06
9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	9,53	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	12,00	11,57	10,99	13,46	9,00	9,00	9,38
9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	9,33	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	12,29	11,85	12,19	13,36	9,00	9,00	8,65
9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	7,26	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	9,59	11,65	11,21	12,14	9,00	9,00	6,88
9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	7,52	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	10,56	11,25	10,98	12,71	9,00	9,00	4,32
9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	8,63	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	11,21	10,56	10,90	11,36	9,00	9,00	7,80
9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	7,37	9,00	9,00	0,00	9,00	9,00	10,93	10,84	10,33	11,09	9,00	9,00	7,94

**ANEXO 4.2 Medición del crecimiento en diámetro (mm) *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a distintas dosis del fungicida benomilo en el segundo día de incubación.**

Benomilo ( $\mu\text{g i.a./ml}$ )	1			2			3			4			5		
	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
0 (Testigo)	39.31	40.10	30.71	38.96	38.76	29.86	37.23	38.97	29.10	41.23	42.97	33.10	38.48	41.05	30.77
	41.52	40.98	32.25	36.20	34.21	26.21	37.42	39.57	29.50	40.42	41.57	32.00	37.07	38.93	29.00
	41.23	40.77	32.00	36.47	36.62	27.55	38.16	38.10	29.13	41.16	42.10	32.63	44.47	41.98	34.23
	39.11	39.59	30.35	34.11	33.39	24.75	39.30	38.32	29.81	41.30	42.32	32.81	46.14	47.15	37.65
0.05	35.41	36.38	26.90	37.13	37.31	28.22	35.51	35.63	26.57	40.21	40.11	31.16	27.54	26.76	18.15
	37.65	38.99	29.32	36.16	37.72	27.94	34.98	34.86	25.92	39.87	39.90	30.89	28.52	28.70	19.61
	36.47	40.26	29.37	36.95	36.30	27.63	36.42	36.77	27.60	40.27	39.97	31.12	24.36	24.29	15.33
	40.83	39.32	31.08	36.33	34.91	26.62	37.84	36.75	28.30	38.53	39.14	29.84	25.14	25.66	16.40
0.10	37.40	35.48	27.44	35.14	35.92	26.53	30.13	30.03	21.08	39.28	39.80	30.54	16.20	16.34	7.27
	37.41	36.71	28.06	35.87	35.53	26.70	31.14	30.66	21.90	39.93	39.86	30.90	17.46	14.34	6.90
	35.55	36.55	27.05	34.97	34.82	25.90	30.02	30.18	21.10	40.59	39.81	31.20	17.21	17.28	8.25
	35.73	36.01	26.87	35.16	35.46	26.31	34.34	31.89	24.12	37.75	37.62	28.69	16.77	19.09	8.93
0.50	34.48	33.86	25.17	33.91	34.73	25.32	11.05	11.12	2.09	33.03	32.95	23.99	10.61	10.76	1.69
	34.28	33.68	24.98	34.89	34.42	25.66	11.51	11.49	2.50	32.69	33.31	24.00	10.64	10.55	1.60
	34.29	34.36	25.33	34.61	34.19	25.40	11.17	10.88	2.03	32.71	32.62	23.67	9.00	9.00	0.00
	34.42	34.61	25.52	34.25	34.01	25.13	13.64	14.33	4.99	33.02	32.81	23.92	9.00	9.00	0.00
1	31.59	33.18	23.39	33.48	32.76	24.12	11.40	10.98	2.19	32.25	31.96	23.11	9.00	9.00	0.00
	32.23	32.36	23.30	32.66	32.22	23.44	10.85	11.40	2.13	32.54	33.02	23.78	9.00	9.00	0.00
	30.27	32.09	22.18	32.97	32.84	23.91	9.00	9.00	0.00	32.61	32.34	23.48	9.00	9.00	0.00
	32.30	32.56	23.43	33.12	32.59	23.86	9.00	9.00	0.00	32.73	32.72	23.73	9.00	9.00	0.00
5	29.14	29.61	20.38	29.57	29.40	20.49	9.00	9.00	0.00	31.26	31.58	22.42	9.00	9.00	0.00
	29.33	28.52	19.93	28.87	28.21	19.54	9.00	9.00	0.00	32.01	32.18	23.10	9.00	9.00	0.00
	29.92	29.29	20.61	29.46	29.75	20.61	9.00	9.00	0.00	32.13	31.82	22.98	9.00	9.00	0.00
	29.46	29.83	20.65	29.31	30.46	20.89	9.00	9.00	0.00	32.68	32.65	23.67	9.00	9.00	0.00
10	24.11	23.77	14.94	25.77	27.43	17.60	9.00	9.00	0.00	29.16	29.65	20.41	9.00	9.00	0.00
	25.47	24.48	15.98	28.04	27.42	18.73	9.00	9.00	0.00	30.37	29.83	21.10	9.00	9.00	0.00
	24.00	24.32	15.16	29.12	29.38	20.25	9.00	9.00	0.00	29.82	29.95	20.89	9.00	9.00	0.00
	25.25	25.27	16.26	28.97	29.68	20.33	9.00	9.00	0.00	30.03	30.11	21.07	9.00	9.00	0.00

## Continuación Anexo 4.2.

6			7			8			9			10			11		
D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
39,03	40,10	30,57	40,16	39,24	30,70	37,87	37,50	28,69	31,46	29,97	20,97	36,32	37,81	28,81	35,80	34,49	25,49
38,97	39,73	30,35	40,08	40,57	31,33	36,78	35,69	27,24	32,09	32,33	23,33	38,62	37,75	28,75	35,78	34,62	25,62
38,09	39,05	29,57	39,68	39,35	30,52	36,29	36,92	27,61	29,08	29,18	20,18	36,47	35,98	26,98	34,58	35,28	26,28
38,45	40,14	30,30	40,36	40,87	31,62	36,58	35,76	27,17	30,62	31,01	22,01	36,74	36,28	27,28	34,94	34,55	25,55
30,73	31,17	21,95	39,57	40,06	30,82	35,48	34,86	26,17	31,51	30,17	21,84	35,19	35,11	26,15	33,92	33,14	24,53
31,28	31,49	22,39	38,93	40,37	30,65	35,17	35,24	26,21	32,29	31,96	23,13	37,52	37,29	28,41	34,53	33,99	25,26
30,84	30,99	21,92	40,11	40,19	31,15	34,32	34,71	25,52	28,92	29,06	19,99	36,04	35,87	26,96	35,00	34,68	25,84
33,08	33,36	24,22	39,24	39,55	30,40	33,91	33,58	24,75	30,37	31,17	21,77	36,33	36,21	27,27	33,71	34,15	24,93
23,98	24,05	15,02	38,84	39,57	30,21	32,49	31,04	22,77	30,38	30,57	21,48	34,13	34,91	25,52	30,76	29,56	21,16
26,39	25,95	17,17	39,94	39,75	30,85	26,89	27,17	18,03	32,19	30,94	22,57	34,51	34,05	25,28	33,10	33,41	24,26
28,19	27,71	18,95	39,83	39,60	30,72	30,78	31,22	22,00	29,32	29,52	20,42	34,20	33,17	24,69	34,73	33,58	25,16
26,69	26,05	17,37	39,32	37,59	29,46	32,03	32,13	23,08	30,51	30,84	21,68	37,95	34,88	27,42	33,85	31,56	23,71
10,12	11,58	1,85	34,82	33,90	25,36	10,19	10,27	1,23	30,32	31,08	21,70	33,81	33,81	24,81	29,88	26,97	19,43
15,65	13,02	5,34	33,12	33,26	24,19	10,49	10,49	1,49	30,58	30,99	21,79	33,89	33,66	24,78	26,50	25,09	16,80
10,81	10,24	1,53	35,83	36,35	27,09	11,04	12,15	2,60	31,99	30,01	22,00	32,75	32,16	23,46	27,64	25,89	17,77
10,05	9,99	1,02	34,87	34,54	25,71	11,03	10,37	1,70	30,37	30,05	21,21	34,31	34,43	25,37	28,19	28,62	19,41
9,00	9,00	0,00	32,11	32,42	23,27	9,00	9,00	0,00	30,38	30,20	21,29	33,76	31,42	23,59	23,72	22,87	14,30
9,00	9,00	0,00	31,77	32,37	23,07	9,00	9,00	0,00	31,29	31,42	22,36	33,88	32,35	24,12	22,50	19,23	11,87
9,00	9,00	0,00	28,02	29,08	19,55	9,00	9,00	0,00	29,83	30,25	21,04	31,80	32,31	23,06	20,14	19,98	11,06
9,00	9,00	0,00	30,67	29,49	21,08	9,00	9,00	0,00	30,96	30,88	21,92	33,43	33,92	24,68	21,15	19,91	11,53
9,00	9,00	0,00	29,42	28,95	20,19	9,00	9,00	0,00	29,20	29,11	20,16	31,55	31,06	22,31	19,49	19,68	10,59
9,00	9,00	0,00	28,89	27,86	19,38	9,00	9,00	0,00	29,19	28,78	19,99	31,83	31,42	22,63	18,43	18,45	9,44
9,00	9,00	0,00	28,18	26,98	18,58	9,00	9,00	0,00	28,45	28,30	19,38	31,70	31,80	22,75	19,78	19,84	10,81
9,00	9,00	0,00	29,76	29,50	20,63	9,00	9,00	0,00	28,40	28,63	19,52	31,58	30,59	22,09	19,38	19,13	10,26
9,00	9,00	0,00	26,14	23,45	15,80	9,00	9,00	0,00	27,54	27,66	18,60	29,47	30,17	20,82	18,65	17,30	8,98
9,00	9,00	0,00	28,06	27,61	18,84	9,00	9,00	0,00	28,18	28,76	19,47	29,40	29,02	20,21	17,23	18,38	8,81
9,00	9,00	0,00	28,15	27,19	18,67	9,00	9,00	0,00	27,45	27,92	18,69	30,01	29,71	20,86	17,77	19,15	9,46
9,00	9,00	0,00	28,01	27,82	18,92	9,00	9,00	0,00	26,72	27,03	17,88	29,60	29,66	20,63	17,66	18,26	8,96

**ANEXO 4.3 Medición del crecimiento en diámetro (mm) *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a distintas dosis del fungicida benomilo en el tercer día de incubación.**

Benomilo ( $\mu\text{g i.a./ml}$ )	1			2			3			4			5		
	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
0 (Testigo)	30,01	29,94	23,85	33,29	31,97	23,88	35,68	34,86	26,27	27,89	27,54	19,10	31,85	33,53	23,69
	32,47	31,90	23,28	30,55	31,71	25,78	35,73	35,98	26,86	27,51	27,24	21,33	34,64	33,77	25,21
	33,05	33,76	23,01	31,91	30,46	25,24	36,42	36,12	27,27	25,38	25,98	20,47	34,49	34,81	25,65
	31,90	30,82	24,01	31,02	30,81	27,09	35,14	35,54	26,34	24,07	25,00	20,60	35,31	32,00	24,66
0,05	28,89	28,28	19,59	30,23	29,18	20,71	32,17	32,74	23,46	28,08	27,63	18,86	29,27	28,65	19,96
	29,75	29,21	20,48	28,94	29,15	20,05	32,45	32,82	23,64	27,29	27,38	18,34	29,16	29,38	20,27
	31,23	31,87	22,55	30,03	31,15	21,59	31,93	32,75	23,34	26,05	25,74	16,90	30,54	30,81	21,68
	29,80	29,42	20,61	28,41	27,49	18,95	33,11	35,69	25,40	25,14	24,45	15,80	29,55	28,79	20,17
0,10	28,23	29,00	19,62	29,11	29,63	20,37	29,27	29,61	20,44	27,15	28,05	18,60	24,74	25,33	16,04
	29,40	29,32	20,36	29,09	28,57	19,83	28,64	28,37	19,51	28,56	27,21	18,89	23,19	27,08	16,14
	30,23	32,97	22,60	29,72	30,45	21,09	29,53	29,16	20,35	26,66	26,86	17,76	21,65	22,59	13,12
	29,11	30,28	20,70	28,33	27,42	18,88	28,72	28,41	19,57	25,58	24,91	16,25	20,91	24,35	13,63
0,50	28,31	28,50	19,41	28,60	28,92	19,76	12,54	13,27	3,91	27,60	27,23	18,42	9,00	9,00	0,00
	31,01	31,08	22,05	28,09	28,16	19,13	9,00	9,00	0,00	28,88	27,11	19,00	9,00	9,00	0,00
	30,15	28,87	20,51	29,64	30,67	21,16	9,00	9,00	0,00	26,18	25,26	16,72	9,00	9,00	0,00
	28,70	30,43	20,57	27,86	28,65	19,26	11,50	12,22	2,86	27,16	27,19	18,18	9,00	9,00	0,00
1	25,32	26,26	16,79	24,44	24,91	15,68	9,00	9,00	0,00	25,06	22,81	14,94	9,00	9,00	0,00
	26,46	26,69	17,58	23,70	23,88	14,79	9,00	9,00	0,00	24,14	23,25	14,70	9,00	9,00	0,00
	26,62	21,63	15,13	22,31	23,73	14,02	9,00	9,00	0,00	22,54	22,52	13,53	9,00	9,00	0,00
	22,28	25,68	14,98	27,39	27,04	18,22	9,00	9,00	0,00	24,37	23,61	14,99	9,00	9,00	0,00
5	25,14	25,69	16,42	24,01	24,03	15,02	9,00	9,00	0,00	24,56	22,36	14,46	9,00	9,00	0,00
	25,15	25,14	16,15	21,14	23,70	13,42	9,00	9,00	0,00	24,06	25,36	15,71	9,00	9,00	0,00
	25,63	25,90	16,77	22,31	24,97	14,64	9,00	9,00	0,00	22,40	21,76	13,08	9,00	9,00	0,00
	22,18	23,02	13,60	22,28	21,49	12,89	9,00	9,00	0,00	23,76	23,05	14,41	9,00	9,00	0,00
10	20,91	21,05	11,98	22,70	23,25	13,98	9,00	9,00	0,00	23,77	22,98	14,38	9,00	9,00	0,00
	21,58	21,30	12,44	22,13	22,57	13,35	9,00	9,00	0,00	24,63	24,57	15,60	9,00	9,00	0,00
	21,82	22,43	13,13	21,63	24,75	14,19	9,00	9,00	0,00	23,51	22,13	13,82	9,00	9,00	0,00
	22,07	21,82	12,95	22,03	21,86	12,95	9,00	9,00	0,00	21,25	21,53	12,39	9,00	9,00	0,00



## Continuación Anexo 4.3.

6			7			8			9			10			11		
D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
28,31	28,88	20,27	30,09	32,49	23,36	33,65	33,56	24,61	30,64	31,72	25,43	28,62	27,81	23,99	34,60	35,50	26,05
27,28	26,91	19,27	29,32	29,65	24,52	33,33	32,83	24,08	32,99	33,32	23,76	32,96	32,14	25,26	32,37	33,36	23,87
30,97	32,11	20,58	30,97	29,09	24,64	33,35	33,46	24,41	29,94	29,50	18,55	29,90	28,84	23,37	33,63	36,44	26,04
27,06	27,90	21,18	32,88	31,07	22,68	32,88	34,40	24,64	29,44	29,75	21,08	29,61	29,26	25,13	34,88	36,64	26,76
25,58	25,83	16,71	31,06	33,06	23,06	31,64	31,58	22,61	26,34	26,98	17,66	28,96	28,18	19,57	28,65	28,19	19,42
26,47	26,03	17,25	33,45	33,09	24,27	32,16	32,15	23,16	33,01	32,72	23,87	31,22	32,49	22,86	29,11	29,64	20,38
28,35	28,21	19,28	31,90	32,22	23,06	32,65	33,07	23,86	31,24	31,75	22,50	29,57	29,89	20,73	30,84	30,35	21,60
25,93	25,11	16,52	29,32	29,48	20,40	32,17	32,35	23,26	30,34	29,66	21,00	29,22	29,69	20,46	31,87	32,42	23,15
23,76	23,14	14,45	29,28	29,15	20,22	28,49	28,02	19,26	26,10	26,63	17,37	28,91	28,51	19,71	23,77	21,87	13,82
24,82	24,77	15,80	27,63	27,94	18,79	27,31	27,65	18,48	27,82	27,43	18,63	28,71	28,04	19,38	20,03	18,46	10,25
23,89	23,68	14,79	28,35	28,77	19,56	30,09	29,91	21,00	28,95	28,51	19,73	28,28	28,08	19,18	19,06	18,11	9,59
24,75	24,83	15,79	29,34	29,56	20,45	31,43	31,09	22,26	29,18	29,14	20,16	28,36	29,63	20,00	20,13	19,35	10,74
9,00	9,00	0,00	28,31	27,45	18,88	9,00	9,00	0,00	25,09	27,30	17,20	27,23	27,52	18,38	22,94	19,50	12,22
12,14	12,33	3,24	26,58	27,60	18,09	9,00	9,00	0,00	30,04	29,86	20,95	26,94	26,58	17,76	19,46	18,28	9,87
9,00	9,00	0,00	26,71	27,59	18,15	9,00	9,00	0,00	30,28	30,08	21,18	25,48	25,95	16,72	19,97	18,20	10,09
9,00	9,00	0,00	28,95	29,37	20,16	9,00	9,00	0,00	28,36	29,63	20,00	26,72	26,98	17,85	19,99	19,11	10,55
9,00	9,00	0,00	27,05	26,37	17,71	9,00	9,00	0,00	24,36	26,10	16,23	25,71	27,98	17,85	21,72	19,26	11,49
9,00	9,00	0,00	26,08	26,88	17,48	9,00	9,00	0,00	28,07	29,60	19,84	23,11	22,93	14,02	19,50	20,38	10,94
9,00	9,00	0,00	25,36	26,72	17,04	9,00	9,00	0,00	26,70	25,09	16,90	27,06	26,76	17,91	20,48	19,64	11,06
9,00	9,00	0,00	28,86	29,00	19,93	9,00	9,00	0,00	29,61	29,86	20,74	26,84	27,40	18,12	21,93	20,57	12,25
9,00	9,00	0,00	24,07	25,68	15,88	9,00	9,00	0,00	23,14	22,04	13,59	22,48	24,22	14,35	20,85	21,96	12,41
9,00	9,00	0,00	24,26	26,14	16,20	9,00	9,00	0,00	23,07	21,84	13,46	25,78	23,97	15,88	20,66	20,24	11,45
9,00	9,00	0,00	22,97	25,92	15,45	9,00	9,00	0,00	23,33	23,49	14,41	23,58	23,87	14,73	21,65	21,58	12,62
9,00	9,00	0,00	24,05	25,90	15,98	9,00	9,00	0,00	20,87	21,82	12,35	22,94	22,69	13,82	19,86	20,60	11,23
9,00	9,00	0,00	19,19	22,12	11,66	9,00	9,00	0,00	23,85	23,58	14,72	22,37	23,87	14,12	19,32	19,34	10,33
9,00	9,00	0,00	22,32	22,72	13,52	9,00	9,00	0,00	22,39	21,87	13,13	24,34	23,46	14,90	19,93	19,56	10,75
9,00	9,00	0,00	20,35	20,24	11,30	9,00	9,00	0,00	22,88	23,19	14,04	24,08	23,83	14,96	19,95	18,60	10,28
9,00	9,00	0,00	22,38	22,20	13,29	9,00	9,00	0,00	20,47	21,58	12,03	22,11	22,72	13,42	19,94	19,03	10,49

**ANEXO 5.1 Medición del crecimiento en diámetro (mm) *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a distintas dosis del fungicida captan en el primer día de incubación.**

Captan ( $\mu\text{g i.a./ml}$ )	1			2			3			4			5		
	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
0 (Testigo)	28,43	27,93	19,18	27,08	27,85	18,47	32,58	32,02	23,30	35,90	34,18	26,04	33,08	31,39	23,24
	26,78	26,17	17,48	25,76	25,75	16,76	31,88	32,07	22,98	34,80	33,37	25,09	35,66	34,89	26,28
	27,71	27,99	18,85	26,81	27,21	18,01	32,23	30,86	22,55	34,24	34,73	25,49	35,75	34,91	26,33
	26,08	26,48	17,28	25,76	26,02	16,89	32,28	33,43	23,86	35,29	34,84	26,07	29,89	31,84	21,87
0,05	22,17	24,28	14,23	23,82	23,19	14,51	27,47	28,71	19,09	24,06	24,00	15,03	26,42	24,59	16,51
	22,64	24,28	14,46	23,29	23,83	14,56	26,95	26,56	17,76	24,52	24,69	15,61	28,05	26,94	18,50
	21,97	24,70	14,34	24,76	23,67	15,22	28,05	27,99	19,02	24,37	24,89	15,63	26,43	25,66	17,05
	23,24	23,46	14,35	23,36	22,87	14,12	25,43	26,18	16,81	23,83	24,29	15,06	25,49	24,55	16,02
0,10	24,29	22,11	14,20	22,22	19,40	11,81	25,24	23,12	15,18	20,07	19,64	10,86	23,32	22,40	13,86
	22,11	22,76	13,44	24,35	23,88	15,12	24,32	26,19	16,26	24,47	24,25	15,36	25,76	25,54	16,65
	21,72	23,32	13,52	21,21	22,12	12,67	24,83	24,58	15,71	20,59	18,81	10,70	23,76	21,76	13,76
	22,06	21,84	12,95	19,05	20,40	10,73	23,22	23,73	14,48	19,26	19,42	10,34	23,79	22,90	14,35
0,50	21,20	20,11	11,66	21,13	23,24	13,19	24,78	24,66	15,72	19,07	19,47	10,27	18,69	19,24	9,97
	21,73	20,71	12,22	20,58	20,76	11,67	24,24	25,00	15,62	19,11	20,68	10,90	20,33	20,06	11,20
	21,80	20,62	12,21	19,98	20,34	11,16	23,49	21,71	13,60	20,48	18,41	10,45	16,29	18,57	8,43
	21,51	20,31	11,91	18,12	18,22	9,17	22,27	21,14	12,71	18,69	18,34	9,52	20,16	17,95	10,06
1	19,42	19,55	10,49	20,28	20,75	11,52	22,35	21,78	13,07	18,96	19,16	10,06	18,71	18,54	9,63
	20,75	20,01	11,38	20,34	20,04	11,19	20,62	21,71	12,17	17,09	18,11	8,60	19,16	19,27	10,22
	18,06	19,40	9,73	20,30	20,48	11,39	23,54	20,08	12,81	16,49	16,36	7,43	17,83	18,43	9,13
	18,09	18,13	9,11	19,80	19,78	10,79	19,47	19,98	10,73	18,52	17,85	9,19	17,81	17,99	8,90
5	13,87	14,38	5,13	15,46	16,01	6,74	23,39	21,27	13,33	18,73	18,52	9,63	15,55	16,99	7,27
	17,42	16,29	7,86	16,10	15,77	6,94	18,48	19,50	9,99	14,71	15,55	6,13	16,12	16,27	7,20
	15,50	16,61	7,06	13,79	15,13	5,46	18,82	19,08	9,95	16,65	16,39	7,52	18,23	18,38	9,31
	15,03	15,56	6,30	16,55	14,71	6,63	21,29	22,02	12,66	17,69	16,36	8,03	16,67	16,91	7,79
10	11,80	12,34	3,07	14,53	14,92	5,73	20,07	20,19	11,13	13,99	14,05	5,02	15,09	15,17	6,13
	13,04	13,09	4,07	14,73	15,84	6,29	19,87	18,77	10,32	14,59	15,00	5,80	14,04	15,40	5,72
	10,70	12,24	2,47	15,56	15,83	6,70	19,74	19,39	10,57	13,07	15,06	5,07	18,16	19,64	9,90
	15,36	14,67	6,02	12,58	12,91	3,75	18,25	18,61	9,43	14,56	15,32	5,94	14,93	15,83	6,38

**Continuación Anexo 5.1.**

6			7			8			9			10			11		
D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
23,41	25,08	15,25	38,51	39,37	29,94	32,91	32,97	23,94	24,68	25,27	15,98	26,88	26,58	17,73	26,27	24,74	16,51
22,90	23,29	14,10	38,99	38,83	29,91	34,22	34,73	25,48	25,60	27,05	17,33	25,31	28,06	17,69	23,32	24,52	14,92
24,75	24,89	15,82	38,59	37,01	28,80	32,54	32,68	23,61	26,22	25,38	16,80	27,52	26,53	18,03	30,03	30,26	21,15
26,60	24,99	16,80	36,67	38,47	28,57	34,48	32,94	24,71	25,31	26,21	16,76	24,86	22,57	14,72	29,04	29,26	20,15
23,70	24,49	15,10	22,41	21,43	12,92	14,57	16,31	6,44	25,35	25,87	16,61	22,00	20,49	12,25	20,00	20,74	11,37
23,71	21,93	13,82	20,19	19,72	10,96	20,78	20,20	11,49	25,80	25,26	16,53	23,72	22,76	14,24	21,39	20,76	12,08
23,77	23,74	14,76	22,37	21,95	13,16	24,62	23,61	15,12	25,71	25,46	16,59	20,42	21,19	11,81	20,78	21,19	11,99
26,61	26,00	17,31	20,96	20,38	11,67	22,47	24,48	14,48	23,79	23,68	14,74	23,46	25,40	15,43	24,46	24,83	15,65
22,56	21,59	13,08	20,68	20,74	11,71	14,55	18,70	7,63	24,65	25,72	16,19	21,82	22,26	13,04	19,97	20,48	11,23
23,44	21,21	13,33	21,34	20,57	11,96	16,40	17,49	7,95	20,21	21,16	11,69	20,91	20,52	11,72	19,15	19,77	10,46
22,31	22,92	13,62	19,71	21,47	11,59	18,73	20,33	10,53	26,29	26,65	17,47	20,90	20,33	11,62	18,68	18,63	9,66
25,36	23,59	15,48	21,73	20,24	11,99	20,60	19,42	11,01	25,42	26,99	17,21	22,57	22,87	13,72	20,70	20,65	11,68
22,49	20,26	12,38	19,44	18,37	9,91	14,17	15,51	5,84	22,08	19,16	11,62	19,81	18,42	10,12	17,28	18,95	9,12
19,11	19,31	10,21	19,30	18,26	9,78	18,14	19,66	9,90	23,24	22,49	13,87	21,81	18,81	11,31	18,08	18,60	9,34
22,04	21,87	12,96	16,27	17,72	8,00	16,16	16,92	7,54	21,75	21,50	12,63	20,40	20,48	11,44	16,50	15,64	7,07
21,89	24,06	13,98	19,52	19,88	10,70	18,63	20,03	10,33	21,43	22,06	12,75	20,14	21,78	11,96	20,17	20,44	11,31
21,29	19,64	11,47	18,07	18,33	9,20	15,43	14,72	6,08	19,46	20,68	11,07	19,33	19,06	10,20	16,49	16,47	7,48
18,76	18,13	9,45	18,25	18,80	9,53	17,93	17,93	8,93	21,25	21,32	12,29	19,64	18,81	10,23	14,78	16,61	6,70
17,56	17,82	8,69	19,25	20,72	10,99	16,21	17,19	7,70	20,97	22,13	12,55	19,78	19,32	10,55	16,15	15,57	6,86
18,34	18,41	9,38	18,35	18,57	9,46	16,56	16,49	7,53	22,78	21,33	13,06	17,78	17,24	8,51	16,54	17,45	8,00
13,00	12,42	3,71	17,24	18,06	8,65	12,87	13,24	4,06	19,87	19,88	10,88	15,10	17,39	7,25	13,96	12,48	4,22
16,68	15,62	7,15	18,18	18,24	9,21	18,48	13,62	7,05	20,90	20,26	11,58	18,83	17,22	9,03	13,11	13,36	4,24
16,17	15,17	6,67	18,22	18,01	9,12	18,71	15,80	8,26	19,12	19,70	10,41	18,85	16,30	8,58	12,88	13,07	3,98
14,26	15,27	5,77	17,57	18,43	9,00	14,64	16,33	6,49	17,92	19,35	9,64	15,68	16,70	7,19	12,11	12,89	3,50
16,04	13,92	5,98	15,79	15,25	6,52	10,50	11,78	2,14	14,74	14,07	5,41	14,17	14,26	5,22	10,91	9,98	1,45
13,85	13,67	4,76	17,43	17,87	8,65	10,58	9,94	1,26	18,27	17,30	8,79	17,56	16,29	7,93	11,53	11,74	2,64
12,92	13,37	4,15	18,18	17,86	9,02	10,91	11,24	2,08	15,80	15,73	6,77	16,52	17,01	7,77	12,62	12,33	3,48
12,94	12,75	3,85	15,13	16,23	6,68	10,72	10,08	1,40	15,86	16,65	7,26	15,68	15,87	6,78	10,58	11,59	2,09

**ANEXO 5.2 Medición del crecimiento en diámetro (mm) *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a distintas dosis del fungicida captan en el segundo día de incubación.**

Captan ( $\mu\text{g i.a./ml}$ )	1			2			3			4			5		
	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
0 (Testigo)	39.31	40.10	30.71	38.96	38.76	29.86	37.23	38.97	29.10	41.23	42.97	33.10	38.48	41.05	30.77
	41.52	40.98	32.25	36.20	34.21	26.21	37.42	39.57	29.50	40.42	41.57	32.00	37.07	38.93	29.00
	41.23	40.77	32.00	36.47	36.62	27.55	38.16	38.10	29.13	41.16	42.10	32.63	44.47	41.98	34.23
	39.11	39.59	30.35	34.11	33.39	24.75	39.30	38.32	29.81	41.30	42.32	32.81	46.14	47.15	37.65
0.05	35.80	35.62	26.71	35.79	36.40	27.10	36.75	36.98	27.87	37.16	38.33	28.75	38.63	38.62	29.63
	34.71	34.89	25.80	37.33	36.62	27.98	34.97	33.79	25.38	37.44	37.15	28.30	38.98	38.49	29.74
	35.88	36.25	27.07	36.38	36.78	27.58	36.45	36.59	27.52	39.19	37.03	29.11	39.26	38.15	29.71
	34.78	34.82	25.80	36.38	35.67	27.03	37.98	35.00	27.49	37.30	38.20	28.75	39.22	38.49	29.86
0.10	30.02	33.75	22.89	32.17	31.51	22.84	35.64	35.91	26.78	37.63	37.95	28.79	38.93	39.03	29.98
	29.05	29.36	20.21	32.71	30.41	22.56	35.15	34.02	25.59	37.50	37.76	28.63	37.46	37.57	28.52
	30.42	29.42	20.92	30.84	30.77	21.81	33.45	33.48	24.47	36.74	37.19	27.97	37.31	39.42	29.37
	29.25	29.75	20.50	33.04	33.19	24.12	34.14	34.59	25.37	38.56	38.93	29.75	39.18	39.11	30.15
0.50	28.12	28.93	19.53	29.14	29.84	20.49	33.29	34.14	24.72	37.43	37.83	28.63	39.02	37.62	29.32
	28.34	28.56	19.45	31.35	31.37	22.36	31.93	31.83	22.88	36.57	37.03	27.80	39.80	39.06	30.43
	29.14	29.23	20.19	30.72	30.10	21.41	30.99	30.72	21.86	37.35	38.07	28.71	39.54	37.11	29.33
	28.24	28.77	19.51	30.25	30.49	21.37	32.69	32.60	23.65	36.40	37.41	27.91	37.14	36.98	28.06
1	28.16	27.48	18.82	28.11	29.59	19.85	32.19	32.46	23.33	36.54	36.37	27.46	32.40	32.58	23.49
	28.31	28.63	19.47	29.57	29.85	20.71	32.58	33.44	24.01	35.86	34.50	26.18	33.76	33.88	24.82
	28.45	29.16	19.81	28.85	30.89	20.87	31.51	32.87	23.19	36.50	36.39	27.45	34.00	33.57	24.79
	26.93	28.60	18.77	29.57	28.15	19.86	30.77	31.28	22.03	35.74	36.74	27.24	32.67	32.50	23.59
5	27.67	27.90	18.79	27.86	28.30	19.08	30.18	29.33	20.76	32.27	30.97	22.62	30.85	26.98	19.92
	27.66	28.27	18.97	30.44	29.50	20.97	30.89	30.94	21.92	31.91	31.67	22.79	26.93	30.78	19.86
	28.24	29.03	19.64	28.08	28.82	19.45	29.12	29.64	20.38	30.78	30.93	21.86	30.07	30.83	21.45
	24.89	27.97	17.43	28.29	29.61	19.95	28.99	29.55	20.27	28.44	29.17	19.81	26.29	27.24	17.77
10	27.27	26.63	17.95	26.57	27.62	18.10	30.54	30.67	21.61	24.56	32.73	19.65	27.83	27.64	18.74
	26.75	27.81	18.28	26.42	25.19	16.81	28.45	27.64	19.05	30.36	30.83	21.60	28.74	26.72	18.73
	27.04	26.62	17.83	24.98	24.89	15.94	26.42	27.93	18.18	28.85	29.38	20.12	27.13	29.21	19.17
	23.90	26.83	16.37	26.54	25.25	16.90	26.15	25.98	17.07	29.90	29.11	20.51	24.34	24.81	15.58

## Continuación Anexo 5.2.

6			7			8			9			10			11		
D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
39,03	40,10	30,57	40,16	39,24	30,70	37,87	37,50	28,69	31,46	29,97	20,97	36,32	37,81	28,81	35,80	34,49	25,49
38,97	39,73	30,35	40,08	40,57	31,33	36,78	35,69	27,24	32,09	32,33	23,33	38,62	37,75	28,75	35,78	34,62	25,62
38,09	39,05	29,57	39,68	39,35	30,52	36,29	36,92	27,61	29,08	29,18	20,18	36,47	35,98	26,98	34,58	35,28	26,28
38,45	40,14	30,30	40,36	40,87	31,62	36,58	35,76	27,17	30,62	31,01	22,01	36,74	36,28	27,28	34,94	34,55	25,55
35,58	35,46	26,52	33,92	34,54	25,23	35,00	36,00	26,50	31,06	29,29	21,18	36,32	36,84	27,58	28,73	29,83	20,28
35,98	35,62	26,80	34,43	35,05	25,74	39,91	38,67	30,29	31,32	31,67	22,50	38,13	38,22	29,18	28,67	29,32	20,00
35,75	35,45	26,60	36,14	36,13	27,14	39,82	38,47	30,15	30,16	30,35	21,26	36,78	37,96	28,37	27,43	28,47	18,95
39,18	40,32	30,75	35,27	35,90	26,59	38,51	38,70	29,61	30,29	30,02	21,16	36,10	36,24	27,17	29,22	26,32	18,77
38,67	38,06	29,37	29,11	29,82	20,47	39,71	39,09	30,40	31,37	30,84	22,11	36,02	35,32	26,67	25,05	23,24	15,15
38,46	38,40	29,43	31,03	32,54	22,79	38,77	38,16	29,47	31,61	31,08	22,35	37,01	37,76	28,39	25,28	26,04	16,66
39,65	37,16	29,41	30,03	27,83	19,93	37,68	38,12	28,90	30,93	30,48	21,71	36,65	37,34	28,00	22,10	22,06	13,08
37,93	39,19	29,56	31,94	29,46	21,70	39,05	38,45	29,75	30,66	31,88	22,27	36,00	35,55	26,78	22,51	22,36	13,44
38,16	37,71	28,94	27,71	27,01	18,36	35,54	33,40	25,47	30,08	30,16	21,12	33,14	32,95	24,05	18,92	17,25	9,09
38,10	39,15	29,63	29,26	30,83	21,05	35,64	34,96	26,30	30,03	30,87	21,45	32,33	32,29	23,31	22,39	24,13	14,26
38,53	38,34	29,44	30,97	30,61	21,79	36,27	36,35	27,31	30,06	29,66	20,86	32,87	32,81	23,84	15,38	14,50	5,94
30,17	39,01	25,59	29,15	29,28	20,22	34,93	34,03	25,48	30,56	30,30	21,43	32,96	32,61	23,79	22,66	22,38	13,52
37,93	37,16	28,55	28,48	29,23	19,86	29,13	26,95	19,04	29,64	30,89	21,27	32,14	32,78	23,46	19,65	20,87	11,26
31,93	31,82	22,88	26,47	27,98	18,23	33,12	34,55	24,84	29,32	29,01	20,17	31,33	31,74	22,54	20,50	20,68	11,59
32,87	31,75	23,31	29,23	29,36	20,30	36,23	35,09	26,66	29,18	29,10	20,14	30,34	30,89	21,62	18,15	18,74	9,45
31,30	31,61	22,46	27,92	27,47	18,70	31,63	33,34	23,49	28,57	28,79	19,68	31,40	31,12	22,26	19,74	19,25	10,50
22,97	25,72	15,35	25,74	24,72	16,23	23,86	28,68	17,27	29,37	29,36	20,37	30,13	29,75	20,94	14,52	17,24	6,88
30,47	28,81	20,64	24,13	23,95	15,04	29,20	28,01	19,61	28,09	28,92	19,51	30,85	31,14	22,00	19,92	19,36	10,64
24,16	30,01	18,09	23,88	23,76	14,82	26,71	26,73	17,72	29,78	30,39	21,09	30,12	30,38	21,25	21,42	21,17	12,30
25,72	26,54	17,13	24,32	24,17	15,25	27,80	26,92	18,36	28,68	28,98	19,83	30,64	29,13	20,89	15,75	13,42	5,59
31,21	30,30	21,76	21,25	21,55	12,40	19,37	15,15	8,26	27,41	26,75	18,08	29,18	29,73	20,46	16,25	16,44	7,35
20,84	19,58	11,21	20,98	20,83	11,91	22,67	22,86	13,77	27,83	27,94	18,89	28,16	28,33	19,25	17,21	17,64	8,43
25,12	24,25	15,69	22,94	22,46	13,70	19,05	19,02	10,04	28,14	28,69	19,42	27,14	27,75	18,45	14,48	15,55	6,02
24,90	26,97	16,94	22,13	22,18	13,16	20,67	18,84	10,76	27,92	27,99	18,96	29,11	29,08	20,10	15,54	14,67	6,11

**ANEXO 5.3 Medición del crecimiento en diámetro (mm) *in vitro* de once aislamientos de *B. cinerea* frente a distintas dosis del fungicida captan en el tercer día de incubación.**

Captan ( $\mu\text{g}$ i.a./ml)	1			2			3			4			5		
	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
0 (Testigo)	30,01	29,94	23,85	33,29	31,97	23,88	35,68	34,86	26,27	27,89	27,54	19,10	31,85	33,53	23,69
	32,47	31,90	23,28	30,55	31,71	25,78	35,73	35,98	26,86	27,51	27,24	21,33	34,64	33,77	25,21
	33,05	33,76	23,01	31,91	30,46	25,24	36,42	36,12	27,27	25,38	25,98	20,47	34,49	34,81	25,65
	31,90	30,82	24,01	31,02	30,81	27,09	35,14	35,54	26,34	24,07	25,00	20,60	35,31	32,00	24,66
0,05	29,50	29,33	20,42	33,24	32,25	23,75	33,18	33,62	24,40	25,09	25,06	16,08	29,76	30,47	21,12
	29,17	28,82	20,00	32,68	33,13	23,91	32,94	32,08	23,51	26,48	25,75	17,12	30,97	31,90	22,44
	30,06	29,29	20,68	25,47	25,16	16,32	33,41	32,43	23,92	24,08	24,41	15,25	32,81	31,87	23,34
	31,29	30,28	21,79	30,99	30,87	21,93	33,14	33,17	24,16	24,27	24,88	15,58	29,98	30,64	21,31
0,10	28,84	28,81	19,83	31,25	31,00	22,13	29,13	28,65	19,89	25,03	25,06	16,05	29,01	29,66	20,34
	27,91	28,24	19,08	29,02	29,59	20,31	28,04	29,82	19,93	24,81	24,72	15,77	30,46	29,97	21,22
	29,46	29,03	20,25	28,02	28,43	19,23	29,53	29,16	20,35	25,37	25,53	16,45	28,75	28,89	19,82
	27,92	28,93	19,43	31,13	31,90	22,52	28,64	28,46	19,55	24,15	24,27	15,21	27,16	27,89	18,53
0,50	26,22	26,41	17,32	27,79	28,30	19,05	27,63	27,51	18,57	23,48	25,80	15,64	27,88	27,66	18,77
	26,06	24,15	16,11	28,56	28,66	19,61	26,33	26,84	17,59	23,38	23,45	14,42	26,67	26,82	17,75
	25,35	24,17	15,76	28,16	28,22	19,19	26,15	26,61	17,38	25,13	25,56	16,35	28,22	27,22	18,72
	24,84	25,14	15,99	27,38	27,62	18,50	25,49	25,78	16,64	23,50	24,08	14,79	26,54	26,48	17,51
1	25,88	22,12	15,00	22,25	22,28	13,27	25,31	25,42	16,37	22,13	22,18	13,16	29,41	28,13	19,77
	24,96	23,77	15,37	27,45	27,20	18,33	24,94	24,63	15,79	23,44	24,11	14,78	27,71	28,26	18,99
	24,51	25,86	16,19	26,43	27,54	17,99	23,17	23,84	14,51	23,67	23,45	14,56	27,98	27,26	18,62
	24,59	23,98	15,29	26,44	25,04	16,74	22,25	22,78	13,52	24,28	24,72	15,50	25,51	26,75	17,13
5	23,98	22,71	14,35	18,79	19,30	10,05	20,35	19,14	10,75	20,17	19,80	10,99	27,16	27,95	18,56
	21,54	22,67	13,11	19,56	19,66	10,61	18,22	18,58	9,40	21,69	23,36	13,53	27,37	28,05	18,71
	21,45	22,05	12,75	20,16	20,22	11,19	17,78	18,49	9,14	20,08	22,71	12,40	26,65	27,22	17,94
	21,76	21,61	12,69	18,38	18,62	9,50	17,27	17,72	8,50	25,96	24,00	15,98	26,93	26,40	17,67
10	18,30	19,24	9,77	17,08	18,11	8,60	20,35	19,14	10,11	19,44	19,31	10,38	26,41	25,81	17,11
	18,91	19,88	10,40	17,65	17,97	8,81	18,22	18,58	9,15	19,12	19,25	10,19	27,47	27,00	18,24
	18,39	18,55	9,47	16,84	16,94	7,89	17,78	18,49	8,99	19,83	22,13	11,98	26,22	25,60	16,91
	19,43	18,85	10,14	18,49	17,71	9,10	17,27	17,72	8,42	19,81	20,50	11,16	24,34	23,53	14,94

**Continuación Anexo 5.3.**

6			7			8			9			10			11		
D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9	D1	D2	Pr-9
28,31	28,88	20,27	30,09	32,49	23,36	33,65	33,56	24,61	30,64	31,72	25,43	28,62	27,81	23,99	34,60	35,50	26,05
27,28	26,91	19,27	29,32	29,65	24,52	33,33	32,83	24,08	32,99	33,32	23,76	32,96	32,14	25,26	32,37	33,36	23,87
30,97	32,11	20,58	30,97	29,09	24,64	33,35	33,46	24,41	29,94	29,50	18,55	29,90	28,84	23,37	33,63	36,44	26,04
27,06	27,90	21,18	32,88	31,07	22,68	32,88	34,40	24,64	29,44	29,75	21,08	29,61	29,26	25,13	34,88	36,64	26,76
29,16	28,48	19,82	27,05	26,37	17,71	31,61	32,55	23,08	30,26	30,41	21,34	27,94	28,30	19,12	28,32	28,42	19,37
25,35	25,90	16,63	26,08	26,88	17,48	32,61	32,17	23,39	24,38	24,78	15,58	27,04	27,79	18,42	27,42	26,98	18,20
29,43	28,56	20,00	25,36	26,72	17,04	32,02	31,51	22,77	31,47	31,22	22,35	25,86	25,30	16,58	28,90	27,21	19,06
28,31	28,55	19,43	28,86	29,00	19,93	30,86	30,71	21,79	28,11	30,71	20,41	26,65	27,30	17,98	27,27	26,00	17,64
28,26	28,40	19,33	27,52	26,29	17,91	26,72	27,26	17,99	28,17	29,30	19,74	26,83	26,41	17,62	25,26	25,37	16,32
25,86	25,63	16,75	27,09	24,24	16,67	26,78	26,16	17,47	27,51	27,17	18,34	26,25	26,11	17,18	26,27	27,28	17,78
27,47	27,67	18,57	30,35	29,44	20,90	26,09	26,17	17,13	25,82	26,21	17,02	26,75	24,82	16,79	27,64	27,98	18,81
27,22	28,19	18,71	24,45	24,42	15,44	31,43	31,09	22,26	26,52	26,19	17,36	25,39	25,92	16,66	24,50	24,71	15,61
26,51	27,37	17,94	27,67	26,37	18,02	27,73	27,52	18,63	26,40	26,93	17,67	25,08	26,16	16,62	23,22	23,71	14,47
26,54	26,46	17,50	24,18	23,64	14,91	23,97	24,17	15,07	26,32	26,77	17,55	26,78	26,87	17,83	22,89	22,54	13,72
25,38	25,21	16,30	28,99	27,05	19,02	26,97	26,29	17,63	25,49	25,86	16,68	26,12	24,32	16,22	21,08	21,56	12,32
27,06	27,90	18,48	25,87	26,63	17,25	25,98	25,97	16,98	26,02	26,46	17,24	24,09	24,59	15,34	20,69	20,65	11,67
27,22	26,80	18,01	24,73	25,62	16,18	27,06	26,36	17,71	25,69	24,70	16,20	25,86	24,64	16,25	19,72	18,49	10,11
26,35	25,30	16,83	25,19	24,22	15,71	26,37	26,81	17,59	26,07	25,45	16,76	23,60	23,58	14,59	18,84	18,28	9,56
27,06	25,21	17,14	25,10	25,31	16,21	25,27	25,11	16,19	24,65	25,96	16,31	23,27	23,42	14,35	19,27	19,05	10,16
27,56	26,87	18,22	24,34	23,87	15,11	25,94	26,41	17,18	24,42	24,73	15,58	23,66	23,21	14,44	18,18	18,25	9,22
24,70	24,96	15,83	21,14	19,45	11,30	22,49	23,85	14,17	19,44	19,79	10,62	22,21	22,71	13,46	16,70	16,95	7,83
23,55	23,97	14,76	19,76	20,41	11,09	21,10	21,27	12,19	22,20	23,76	13,98	21,38	21,57	12,48	17,45	15,96	7,71
24,41	23,13	14,77	19,06	20,23	10,65	22,13	23,28	13,71	20,48	20,35	11,42	19,84	19,14	10,49	15,59	16,84	7,22
23,44	23,68	14,56	21,08	21,69	12,39	18,40	19,46	9,93	19,31	20,05	10,68	21,96	21,38	12,67	16,37	16,44	7,41
17,54	18,57	9,06	17,33	17,01	8,17	17,90	18,01	8,96	17,49	18,97	9,23	19,12	19,88	10,50	15,84	16,03	6,94
16,83	18,20	8,52	18,78	18,20	9,49	17,02	17,72	8,37	17,64	18,57	9,11	18,49	19,95	10,22	16,87	15,73	7,30
18,07	17,14	8,61	18,27	18,48	9,38	18,52	17,22	8,87	19,17	19,09	10,13	18,07	18,35	9,21	15,42	15,93	6,68
18,23	17,63	8,93	18,54	18,08	9,31	18,74	19,87	10,31	18,05	18,84	9,45	18,12	18,38	9,25	16,29	16,14	7,22