

RESISTANCE OF *Botrytis cinerea* FROM STRAWBERRY (*Fragaria x ananassa* Duch.) TO FUNGICIDES IN MICHOACAN MEXICO

RESISTENCIA DE *Botrytis cinerea* DE FRESA (*Fragaria x ananassa* Duch.) A FUNGICIDAS EN MICHOACÁN MÉXICO

Adán Álvarez-Medina¹, Hilda V. Silva-Rojas², Santos G. Leyva-Mir¹, Nahum Marbán-Mendoza¹, Ángel Rebollar-Alviter^{3*}

¹Protección Vegetal. Universidad Autónoma de Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. ²Laboratorio de Biotecnología de Semillas. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ³Centro Regional Morelia-Universidad Autónoma Chapingo. Periférico Paseo de la República No.1000. 58170. Morelia, Michoacán, México. (rebollaralviter@gmail.com).

ABSTRACT

Gray mold caused by *Botrytis cinerea* Pers. is one of the most important diseases of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.), and fungicide resistance is a concern. The objective of this research was to evaluate the sensitivity of *B. cinerea* isolates to the fungicides iprodione and thiophanate-methyl in two strawberry-producing areas in Mexico. Sixty-two *B. cinerea* isolates collected from strawberry fruits from Maravatio Valley (MV) and Zamora-Jacona Valley (ZJ) in Michoacan, Mexico, were used to determine the sensitivity distribution based on mycelium growth (MG) and conidial germination (CG). Each monosporic isolate was grown in 4 plates containing media amended with 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of iprodione and 0, 0.1, 10, 100, 1000 and 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ thiophanate-methyl, and the experiment was conducted twice. The effective concentration (EC_{50}) that inhibits 50 % of mycelial growth and conidial germination was determined for each isolate-fungicide combination by fitting the log-logistic model to the data. Fungicide sensitivity distributions were illustrated by box plots and histograms, and compared by the Kolmogorov-Smirnov non-parametric test. For iprodione, there were significant differences between the sensitivity distributions ($p \leq 0.0001$) of both of the sampling areas for mycelia. In MV, the median EC_{50} was 0.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, while that of the ZJ isolates was 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. There were no significant differences in the sensitivity distributions of CG ($p=0.47$) between producing areas for conidia (median $\text{EC}_{50} = 3.73 \mu\text{g mL}^{-1}$). For thiophanate-methyl, the sensitivity distribution for mycelia was scattered and bimodal, with

RESUMEN

Moho gris causado por *Botrytis cinerea* Pers. es una de las enfermedades más importantes de las fresas (*Fragaria x ananassa* Duch.), junto con la preocupación de resistencia a fungicidas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la sensibilidad de aislados de *B. cinerea* a los fungicidas iprodiona y metil-tiofanato en dos áreas productoras de fresas en México. Se usaron 62 aislados de *B. cinerea* recolectados de frutos de fresas del Valle de Maravatio (VM) y del Valle Zamora-Jacona (ZJ) en Michoacán, México, para determinar la distribución de la sensibilidad basado en el crecimiento de micelio (CM) y germinación conidial (GC). Cada uno de los aislados monospóricos se cultivó en 4 placas que contenían medios adicioandos con 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de iprodiona y 0, 0.1, 10, 100, 1000 y 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metil-tiofanato y el experimento se realizó dos veces. La concentración efectiva (CE_{50}) que inhibe 50 % del crecimiento micelio y germinación conidial fue determinado por cada combinación de aislado del hongo y fungicida, ajustando el modelo log-logístico a los datos. Las distribuciones de la sensibilidad a los fungicidas se ilustraron por diagramas de caja e histogramas y comparadas por la prueba no paramétrica de Komogrov-Smirnov. Para iprodiona hubo diferencias significativas entre las distribuciones de sensibilidad ($p \leq 0.0001$) de las dos áreas de muestreo para micelio. En el VM, la mediana de la CE_{50} fue 0.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que de los aislados de ZJ fue 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No hubo diferencias significativas en las distribuciones de la sensibilidad de la GC ($p=0.47$) entre las áreas productoras para conidios (mediana $\text{CE}_{50} = 3.73 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para tiofanato-metil, la distribución de sensibilidad fue dispersa y bimodal, con diferencias significativos entre áreas de muestreo ($p \leq 0.002$). La mediana de la CE_{50} de CM fue 3.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en VM, y 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en ZJ. No hubo

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: February, 2016. Approved: October, 2016.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 51: 783-798. 2017.

significant differences between the sampling areas ($p \leq 0.002$). The median EC_{50} of MG was $3.11 \mu\text{g mL}^{-1}$ in MV, and $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ in ZJ. There were no significant differences between the sensitivity distributions from MV and ZJ in the conidial germination assay ($p=0.13$, $K_s=1.17$). The EC_{50} varied from 0.01 to $>2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (median= $2.01 \mu\text{g mL}^{-1}$). Resistance in *B. cinerea* to thiophanate-methyl and iprodione is widespread in strawberry-producing areas in Michoacan.

Key words: fungicide resistance, benzimidazole, dicarboximides.

INTRODUCTION

The commercial cultivation of strawberry (*Fragaria x ananassa*) in Mexico began in the late 1940s in the state of Guanajuato and in the 1950s in the crop extended to the state of Michoacan in the Zamora Valley, and later to other regions such as Panindicuaro and Maravatio. Production of this crop has expanded significantly in the north, especially in the state of Baja California (Medina y Aguirre, 2004; Sánchez, 2008).

Mexico grows more than 9000 ha of strawberry and more than 50 % of this crop is grown in the state of Michoacan, mainly in the valleys of Zamora-Jacona and Maravatio (SIAP, 2014). Among the most important diseases is gray mold caused by the fungus *Botrytis cinerea*, which can cause severe losses when conditions favor disease development, especially if they coincide with the flowering period (Sutton, 1998). Given the national and international increase in demand for this berry, the cultivated area has increased in recent years. The advancement in technology for strawberry production has also favored an increase in the intensity of fungicide applications to manage the gray mold, because the geographic area for strawberry production has favorable conditions for the disease development.

Cultural management of the disease is based on the establishment of healthy plants and crop debris removal. However, chemical fungicides, especially those with a specific mode of action, provide a better disease management. Among these fungicides, iprodione (dicarboximide), thiophanate-methyl (benzimidazole), pyraclostrobin and azoxystrobin (QoI), fenhexamide (hydroxianilide), cyprodinil + fludioxonil (phenylpyrrole + anilinopyrimidine) and pyrimethanil (anilinopyrimidine) are classified as medium-high risk fungicides for the selection of resistance in *B. cinerea* (FRAC, 2008).

diferencias significativas entre las distribuciones de sensibilidad de VM y ZJ en el análisis de la germinación conidial ($p=0.13$, $K_s=1.17$). La CE_{50} varió de 0.01 a $>2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (mediana= $2.01 \mu\text{g mL}^{-1}$). La resistencia en *B. cinerea* a metiltiofanato y a iprodiona está extendida en áreas productoras de fresas en Michoacán.

Palabras clave: resistencia de fungicida, benzimidazol, dicarboximidias.

INTRODUCCIÓN

El cultivo comercial de fresa (*Fragaria x ananassa*) en México comenzó a los finales de la década de los 40 en estado de Guanajuato y en los años 50 el cultivo se extendió al estado de Michoacán en el Valle Zamora, y después a otras regiones como Panindicuaro y Maravatio. La producción de este cultivo ha extendido significativamente hasta el norte, especialmente en el estado de Baja California (Medina y Aguirre, 2004; Sánchez, 2008).

México cultiva más de 9,000 ha de fresa y más de 50 % de este cultivo se desarrolla en el estado de Michoacán, principalmente en los valles de Zamora-Jacona y Maravatio (SIAP, 2014). Entre las enfermedades más importantes está el moho gris causado por el hongo *Botrytis cinerea*, el cual puede causar pérdidas sustanciales cuando las condiciones favorecen el desarrollo de enfermedades, en especial si coincide con el periodo de floración (Sutton, 1998). Dada la creciente demanda para esta frutilla, el área de cultivo también ha aumentado en los últimos años. El avance en la tecnología para la producción de la fresa también ha favorecido el aumento en la intensidad de las aplicaciones de fungicida para control el moho gris, ya que el área geográfica para la producción de la fresa tiene condiciones favorables para el desarrollo de enfermedades.

El control cultural de la enfermedad se basa en el establecimiento de plantas sanas y la eliminación de los residuos del cultivo. Sin embargo, los fungicidas químicos, en especial aquellos con modo de acción específico proporcionan un mejor control de la enfermedad. Entre estos fungicidas, iprodione (dicarboximida), metil-tiofanato (benzimidazol), piraclostrobin y azoxystrobin (QoI), fenhexamida (hydroxianilidas), ciprodinil + fludioxonil (fenilpirrole + anilinopyrimidina) and pirimetanil (anilinopirimidina) están clasificados como fungicidas de riesgo medio-alto para la selección de resistencia a *B. cinerea* (FRAC, 2008).

Resistance of *B. cinerea* to single-site fungicides with different modes of action is documented, even shortly after the development and use of these fungicides in the late 1960s (Leroux, 2007). There are reports about development of resistance of *B. cinerea* to benzimidazole and dicarboximide fungicides (Yourman and Jeffers, 1999; Lennox and Spotts, 2003; Li *et al.*, 2007; Leroux, 2007; Banno *et al.*, 2008), as well as to QoI (Quinone Outside Inhibitors), anilinopyrimidines, hydroxianilides and phenylpyrroles (Myresiotis *et al.*, 2007; Grabke *et al.*, 2014). Applying different discriminatory doses against strawberry isolates from California (USA), Mercier *et al.* (2010) found that 92 % of the strawberry isolates were resistant to thiophanate-methyl, 25 % to fenhexamide, 28 % to cyprodinil + fludioxonil and 66 % to pyraclostrobin + boscalid. Out of the active ingredients tested, 85 % of the isolates were resistant to at least two of them. Similarly, in a study with 353 blueberry, raspberry and currant isolates of *B. cinerea* in Germany, 40.5 % of the isolates were highly resistant to thiophanate-methyl, 64 % to iprodione, 45 % to fenhexamide, 76.8 % to trifloxystrobin, 21 % to boscalid and 14 % to cyprodinil. In addition, 18 % of the isolates were resistant to the five tested active ingredients, and between 6 % and 23 % of the isolates were highly or moderately resistant to one of the five tested active ingredients (Weber, 2011). In Florida (USA), resistance to multiple fungicides was reported in *B. cinerea*, frequently associated with subpopulations that are resistant to three fungicides (boscalid-QoI-anilinopyrimidines or boscalid-QoI-hydroxianilides), revealing the wide distribution of *B. cinerea* resistance to multiple fungicides that contain the most common point mutations associated with each of these chemical groups (Amiri *et al.*, 2014). Similar results were obtained in isolates from the Carolinas (USA), where 66.7 % of the collected *B. cinerea* isolates were resistant to pyraclostrobin and boscalid-pyraclostrobin, in most cases related to the G143A mutation conferring high levels of resistance to strobilurin and H272R and H272Y to boscalid (Fernández-Ortuño and Schnabel, 2012).

Benzimidazole fungicides are systemic, broad-spectrum fungicides used commercially for controlling plant diseases since the early 1960s and include benomyl, carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl (Leroux, 2007). These fungicides inhibit mycelial growth and cause distortions of germ

La resistencia de *B. cinerea* a fungicidas de un único sitio con distintos modos de acción se ha documentado, aun poco después del desarrollo y uso de estos fungicidas al final de la década de 1960 (Leroux, 2007). Hay informes sobre el desarrollo de resistencia de *B. cinerea* a benzimidazoles y fungicidas dicarboximidas (Yourman and Jeffers, 1999; Lennox and Spotts, 2003; Li *et al.*, 2007; Leroux, 2007; Banno *et al.*, 2008), así como a QoI (Inhibidores externos de la Quinona), anilino pirimidinas, hidroxianilidas y fenilpirroles (Myresiotis *et al.*, 2007; Grabke *et al.*, 2014). A través de la aplicación de distintas dosis discriminatorias contra aislados de *B. cinerea* de fresas de California (EUA), Mercier *et al.* (2010) encontró que 92 % de los aislados fueron resistentes a metil-tiofanato, 25 % a fenhexamida, 28 % a ciprodinil + fludioxonil y 66 % a piraclostrobin + boscalid. De los ingredientes activos probados, 85 % de los aislados fueron resistentes a por lo menos dos de ellos. En un estudio con 353 aislados de blueberry, frambuesas y grosella de *B. cinerea* en Alemania, 40.5 % de los aislados fueron altamente resistentes a metil-tiofanato, 64 % a iprodiona, 45 % a fenhexamida, 76.8 % a trifloxistrobina, 21 % a boscalid and 14 % to ciprodinil. Además, 18 % de los aislados fueron resistentes a los cinco ingredientes activos probados, y entre 6 % y 23 % de los aislados fueron altamente o moderadamente resistentes a uno de los cinco ingredientes activos probados (Weber, 2011). En Florida (EUA), la resistencia a múltiples a fungicidas fue reportada en *B. cinerea* frecuentemente asociada con subpoblaciones resistentes a tres fungicidas (boscalid-QoI-anilino pirimidinas or boscalid-QoI-hydroxianilides), revelando la amplia distribución de la resistencia de *B. cinerea* a múltiples fungicidas que contienen las mutaciones puntuales más comunes asociadas con cada uno de estos grupos químicos (Amiri *et al.*, 2014). Resultados similares fueron obtenidos de aislados de las Carolinas (EUA), donde 66.7 % de los aislados de *B. cinerea* colectados fueron resistentes al piraclostrobin y boscalid-piraclostrobin, en la mayoría de los casos se relacionó a la mutación G143A, confiriendo niveles altos de resistencia a estrobilurinas y H272R y H272Y a boscalid (Fernández-Ortuño and Schnabel, 2012).

Los fungicidas Benzimidazoles son sistémicos de amplio espectro, y usados comercialmente para controlar enfermedades de plantas desde los primeros años de la década de 1960 e incluyen benomilo,

tubes, interfering with the polymerization of the β -tubulin protein to inhibit cell division. Resistance is the result of at least three point mutations, including those arising at positions 198 and 200 of the β -tubulin gene (Yarden and Katan, 1993; Leroux, 2007; Banno *et al.*, 2008).

Dicarboximide fungicides inhibit conidial germination but mainly act by inhibiting mycelial growth (Leroux 2007). Point mutations were identified in the MAP/histidine kinase gene, which is associated with osmotic signal transduction, conferring different degrees of fungicide resistance (Cui *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2006; Leroux *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2004). In addition, the gene encoding a class III histidine kinase (BOS1) was sequenced from dicarboximide-susceptible and resistant isolates in which two types of mutations are detected: a mutation at position 365 where serine replaced isoleucine (I365N) and one at position 369 where proline replaced glutamine (Q369P) (Ma *et al.*, 2007). However, studies using isolates from North Carolina, South Carolina and Florida indicate that moderately resistant isolates are associated with the N373S and Q369P *B. cinerea* mutations, while those with low resistance are associated with I365S or I365N, but no specific mutation was associated with highly resistant isolates, suggesting the existence of other mutations that confer this phenotype (Grabke *et al.*, 2014).

Strawberry producers from the state of Michoacan noticed a lack of efficacy of commonly used fungicides in the management of gray mold. Some of the active ingredients of these fungicides have been on the market for more than 30 years, as is the case for benzimidazole and dicarboximide. The sensitivity status of *B. cinerea* to these fungicides is unknown, but it is likely that the resistance of this pathogen to these group of fungicides is widely distributed in this strawberry production area.

The objective of this research was to determine the distribution of *B. cinerea* sensitivity in isolates from two major strawberry producing areas in the state of Michoacan (Maravatio and Zamora-Jacona valleys) to the fungicides thiophanate-methyl (benzimidazole) and iprodione (dicarboximide). Knowing the sensitivity status of this fungus in these producing areas will directly impact the production costs for producers, reducing the selection pressure on fungi populations and providing a basis for the

carbendazim, tiabendazole y metil-tiofanato (Leroux, 2007). Estos fungicidas inhiben el crecimiento micelial y provocan distorsiones de tubos germinativos, interfiriendo con la polimerización de la proteína β -tubulina e impiden la división celular. La resistencia resulta de por lo menos tres mutaciones puntuales, incluyendo las presentes en las posiciones 198 y 200 del gen de la β -tubulina (Yarden and Katan, 1993; Leroux, 2007; Banno *et al.*, 2008).

Los fungicidas dicarboximidados inhiben la germinación conidial, pero actúan principalmente inhibiendo el crecimiento de micelio (Leroux 2007). Mutaciones puntuales se identificaron en el gen de la MAP/histidina kinasa, que está asociado con la transducción de señales osmóticas, confiriendo diferentes grados de resistencia a fungicidas (Cui *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2006; Leroux *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2004). Además, el gen que codifica la clase III de histidina kinasa (BOS1) fue secuenciado de aislados susceptibles y resistentes a dicarboximidados, en el que se detectan dos tipos de mutaciones: una en la posición 365 en la cual el aminoácido serina reemplaza a isoleucina (I365N), y una en la posición 369 donde prolina reemplaza a glutamina (Q369P) (Ma *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios usando aislados de *B. cinerea* de Carolina Norte, Carolina Sur y Florida indican que aislados moderadamente resistentes están asociados con las mutaciones N373S and Q369P, mientras aquellos con resistencia baja están asociados con I365S or I365N, pero ninguna mutación específica se asoció con los aislados altamente resistentes, indicando la existencia de otras mutaciones que confieren este fenotipo (Grabke *et al.*, 2014).

Los productores de fresas del estado de Michoacán notaron una falta de eficiencia de los fungicidas usados con más frecuencia para el control del moho gris. Algunos de los ingredientes activos de estos fungicidas han estado en el mercado por más de 30 años, como los benzimidazol y dicarboximidados. El estatus de la sensibilidad de *B. cinerea* a estos fungicidas es desconocido, pero es probable que la resistencia de este patógeno a estos grupos de fungicidas esté ampliamente distribuida en el área productoras de fresas.

El objetivo de esta investigación fue determinar la distribución de la sensibilidad de *B. cinerea* en aislados de dos áreas productoras de fresas en el estado de Michoacán (Los Valles de Maravatio y Zamora-Jacona) a los fungicidas metil-tiofanato (benzimidazol) e iprodiona (dicarboximide).

design of fungicide resistance management programs to maximize the effectiveness of these tools in an integrated disease management approach.

MATERIAL AND METHODS

Sampling sites

The isolates of *B. cinerea* were collected from strawberry fruits with symptoms of gray mold and leaves in the Maravatío (19° 52' 44.2092" N, 100° 24' 29.595" W) and Zamora-Jacona (19° 59' 9.0168" N, 102° 18' 58.9608" W) valleys during the 2009 and 2010 growing seasons.

Monosporic isolates

Small pieces of diseased tissue from strawberry fruits were disinfested with a solution of 1 % sodium hypochlorite for 2 min, rinsed with sterile distilled water, blotted dry in the hood for 10 min and placed in Petri dishes containing PDA medium (Difco Lab. Sparks, MD, USA). The plates were incubated under fluorescent light for 5 d at room temperature (22 ± 2 °C) to promote sporulation. From sporulated cultures, a suspension of 1×10^3 conidia mL^{-1} was prepared, and 0.1 mL suspension was placed on Petri dishes with water agar (2 %) medium and incubated at room temperature for 6 h. After incubation, the germinated conidia were isolated and placed individually in Petri dishes with PDA medium. Once the cultures covered the plates, they were stored at 4 °C for use in the sensitivity tests. Sixty two monosporic isolates (Table 1) were obtained.

Morphological and phylogenetic identification

The preliminary identification of the isolates was performed based on colony color, conidia morphology and conidiophores (Elad *et al.*, 2007). To confirm the identification, eight randomly selected isolates were obtained from the field collections listed in Table 1 (Z7A-1-3, Z7A, Z16C-2-3, Z14A, Z14A-2, Y-1, Z7C and Z7C-2) and the isolates were grown on PDA at room temperature (22 ± 2 °C) for 7 d. The phylogenetic identification was performed via the PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA using the primers ITS4 and ITS5 (White *et al.*, 1990). A micropipette was used to place a portion of mycelium of each isolate in Eppendorf tubes with 30 μL of a lysis solution developed at the Colegio de Posgraduados (Silva-Rojas, personal communication, 2009). The tubes were placed on a Peltier Thermal Cycler PTC 200 (Bio-Rad, USA) at 95 °C for 5 min and centrifuged at 12 000 \times g for 5 min. In new tubes, 45 μL of HPLC water for PCR and 5 μL of supernatant were centrifuged

Conocer el estatus de sensibilidad de este hongo en estas áreas productoras impactará directamente en los costos de producción para productores, reduciendo la presión de selección en poblaciones de hongo, proporcionando una base para el diseño de programas de manejo de la resistencia a fungicida para maximizar la eficacia de estas herramientas en un enfoque de manejo integrado de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

Los aislados de *B. cinerea* se recolectaron de frutos de fresa y hojas con síntomas de moho gris en las hojas en el Valle Maravatío (19° 52' 44.2092" N, 100° 24' 29.595" W) y Zamora-Jacona (19° 59' 9.0168" N, 102° 18' 58.9608" W) durante el ciclo de cultivo de 2009 y 2010.

Aislados monospóricos

Trozos pequeños de tejidos enfermos de los frutos de fresa fueron desinfestados con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por 2 min, enjuagados con agua destilada estéril, secados en la campana por 10 minutos y colocados en placas de Petri que contenía medio de cultivo PDA (Difco Lab. Sparks, MD, USA). Las placas se incubaron bajo luz fluorescente por 5 d a temperatura del laboratorio (22 ± 2 °C) para promover la esporulación. A partir de cultivos esporulados se preparó una suspensión de 1×10^3 conidios mL^{-1} y 0.1 mL de suspensión se colocó en placas de Petri con medio de agua agar (2 %) e incubado a temperatura del laboratorio por 6 h. Después, los conidios germinados fueron aislados y colocados individualmente en placas de Petri con medio PDA. Una vez que los cultivos llenaron las placas, se conservaron a 4 °C para su uso en las pruebas de sensibilidad. Se obtuvieron 62 aislados monospóricos (Cuadro 1).

Identificación morfológica y filogenética

La identificación preliminar de los aislados se realizó con base a color de colonia, morfología de conidios y conidiofóros (Elad *et al.*, 2007). Para confirmar la identificación, ocho aislados, seleccionados al azar, se obtuvieron de las recolectas de campo enlistados en el Cuadro 1 (Z7A-1-3, Z7A, Z16C-2-3, Z14A, Z14A-2, Y-1, Z7C y Z7C-2) y se crecieron los aislados en PDA a temperatura del laboratorio (22 ± 2 °C) por 7 d. La identificación filogenética se realizó a través de la amplificación por PCR de la región ITS de ADN ribosomal, usando los iniciadores ITS4 and ITS5 (White *et al.*, 1990). Una micro pipeta se usó para colocar

Table 1. *Botrytis cinerea* isolates from two strawberry-producing regions in Michoacan, Mexico, whose sensitivity to the fungicides iprodione and thiophanate-methyl was determined in the 2009-2010 season.**Cuadro 1. Aislados de *Botrytis cinerea* de dos regiones productoras de fresa en Michoacán, México, cuya sensibilidad a los fungicidas iprodiona y metil-tiofanato fue determinada en el ciclo 2009-2010.**

No.	Isolate	Cultivar	Source of collection	No.	Isolate	Cultivar	Source of collection
1	Z6A-1	Camarosa	Zamora-Jacona	32	Z16C-4	Camino Real	Zamora-Jacona
2	Z6A-3	Camarosa	Zamora-Jacona	33	M12A2-1	Albion	Maravatio ^b
3	Z6B-1	Camino Real	Zamora-Jacona	34	M12A2-2	Albion	Maravatio
4	Z6B-2	Camino Real	Zamora-Jacona	35	M12B-1	Albion	Maravatio
5	Z6B-3	Camino Real	Zamora-Jacona	36	M12B-2	Albion	Maravatio
6	Z7A-1	Oso Grande	Zamora-Jacona	37	M12B-3	Albion	Maravatio
7	Z7A-2	Oso Grande	Zamora-Jacona	38	M15A-1	Albion	Maravatio
8	Z7A-3	Oso Grande	Zamora-Jacona	39	M15A-2	Albion	Maravatio
9	Z7A-4	Oso Grande	Zamora-Jacona	40	M15A-3	Albion	Maravatio
10	Z7C-1	Albion	Zamora-Jacona	41	M16A-1	Albion	Maravatio
11	Z7C-2	Albion	Zamora-Jacona	42	M16A-2	Albion	Maravatio
12	Z7C-3	Albion	Zamora-Jacona	43	M16A-3	Albion	Maravatio
13	Z8B-3	Festival	Zamora-Jacona	44	M17A-3	Albion	Maravatio
14	Z9B-3	Festival	Zamora-Jacona	45	M19A-1	Albion	Maravatio
15	Z11A-1	Camarosa	Zamora-Jacona	46	M19A-2	Albion	Maravatio
16	Z11A-2	Camarosa	Zamora-Jacona	47	M19A-3	Albion	Maravatio
17	Z12B-1	Festival	Zamora-Jacona	48	M19A-4	Albion	Maravatio
18	Z12B-2	Festival	Zamora-Jacona	49	M20A-1	Albion	Maravatio
19	Z12B-3	Festival	Zamora-Jacona	50	M20A-2	Albion	Maravatio
20	Z12B-4	Festival	Zamora-Jacona	51	M21B-1	Albion	Maravatio
21	Z13C-2	Festival	Zamora-Jacona	52	M21B-2	Albion	Maravatio
22	Z14A-1	Albion	Zamora-Jacona	53	M21B-3	Albion	Maravatio
23	Z14A-2	Albion	Zamora-Jacona	54	M26A-1	Camino Real	Maravatio
24	Z14A-3	Albion	Zamora-Jacona	55	M26A-2	Camino Real	Maravatio
25	Z14B-1	Albion	Zamora-Jacona	56	M26A-3	Camino Real	Maravatio
26	Z14B-3	Albion	Zamora-Jacona	57	M27A-1	Albion	Maravatio
27	Z16B-1	Festival	Zamora-Jacona	58	M27A-2	Albion	Maravatio
28	Z16B-2	Festival	Zamora-Jacona	59	M27A-3	Albion	Maravatio
29	Z16C-1	Camino Real	Zamora-Jacona	60	M28A-1	Tioga	Maravatio
30	Z16C-2	Camino Real	Zamora-Jacona	61	M28A-2	Tioga	Maravatio
31	Z16C-3	Camino Real	Zamora-Jacona	62	M28A-3	Tioga	Maravatio

for 2 min. From this solution, 5 μ L of each DNA solution from each isolate was used as template DNA. The mixture reaction was prepared in a final volume of 25 μ L containing 2 U of *Taq* DNA polymerase, 10X *Taq* DNA polymerase buffer, 10 pM of each primer and 200 mM dNTPs (Promega, USA). The amplification program was as follows: one cycle of initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles with denaturation at 95 °C for 2 min, one cycle at 56 °C for 1 min and 72 °C for 2 min; and a final extension cycle at 72 °C for 7 min.

The PCR products were verified by agarose gel electrophoresis using 1.5 % 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) at 87 V cm^{-1} for 1 h. The gel was stained with ethidium bromide and the bands were visualized on the Infinity 1000/26MX Xpress (Vilber Lourmat, Germany) photo documentation system. Before

una porción de micelio de cada aislado en tubos de Eppendorf con 30 μ L de una solución de lisis desarrollada en el Colegio de Posgraduados (Silva-Rojas, comunicación personal, 2009). Los tubos se colocaron en un termociclador, Peltier Thermal Cycler PTC 200 (Bio-Rad, USA), a 95 °C por 5 min y centrifugados a 12 000 g por 5 min. En tubos nuevos, 45 μ L de agua HPLC para PCR y 5 μ L de sobrenadante se centrifugaron por 2 min. De esta solución, 5 μ L de cada solución de ADN de cada aislado se usó como ADN molde. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 μ L 2 U de ADN of *Taq* polimerasa, 10X buffer *Taq* ADN 10 pM de cada iniciador y 200 mM de dNTPs (Promega, USA). El programa de amplificación fue así: un ciclo de desnaturación inicial a 95 °C por 4 min, luego 35 ciclos de desnaturación a 95 °C por 2 min, un ciclo a 56 °C por

sequencing, the PCR products were purified using ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) following the manufacturer's instructions. The sequencing reaction was prepared using the Big Dye Terminator v3.0 (Applied Biosystems, USA), and the fragments were resolved by capillary electrophoresis on the Genetic DNA Analyzer Model 3730 (Applied Biosystems, USA). The regions corresponding to both sequences were assembled and edited with the BIOEDIT v7.2.0 software (Hall, 1999). The consensus sequences of each isolate were compared with those in the GenBank database, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), with the option BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

Fungicidas

Cercobin M[®] (79 % active ingredient, BASF Mexicana, Zapopan, Jalisco, Mexico) and Rovral 50 PH[®] (50 % active ingredient, Bayer Crop Science in Mexico, DF) were used as sources of the active ingredients thiophanate-methyl and iprodione, respectively.

Inhibition assay of mycelial growth

The PDA culture medium was prepared and kept in a water bath at 60 °C until use. Separately, a stock solution of 10 000 µg mL⁻¹ AI of each fungicide was prepared, and serial dilutions of 1:10, 1:100 and 1:1000 were made in 250-mL sterile flasks. The appropriate proportion of each of these dilutions was mixed with the PDA medium to obtain final fungicide concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50 and 100 µg mL⁻¹ for iprodione, and 0, 0.1, 1, 0, 100, 1000 and 2000 µg mL⁻¹ AI for thiophanate-methyl. Approximately 10 mL of fungicide-amended media were poured into 60 x 0.5 mm Petri dishes.

From the margins of 5-day-old colonies, 0.5-cm diameter mycelial plugs were placed in the center of four 6-cm Petri dishes containing fungicide-amended media. These plates were sealed with Parafilm[®], placed in Ziploc[®] plastic bags and incubated in the dark in the laboratory (22±2 °C) for 72 h. After incubation, the diameter of the colonies was measured in two directions for each of the tested doses and averaged. The mycelium growth (mm) of each isolate tested in the four replicates was averaged and used to calculate the relative growth (RG) in relation to the average mycelial growth in the plates not amended with fungicide for each of the concentrations. The means of micelial growth were used to estimate the effective dose 50 (EC₅₀). Each assay was performed twice.

Inhibition assay on conidial germination

The same fungicide concentrations that were used for the mycelial growth assay were evaluated in water agar medium.

1 min y 72 °C por 2 min; y un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min.

Los productos de PCR se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con 1X TAE Buffer (Tris-Acetate-EDTA) corrido a 87 V cm⁻¹ por 1 h. Este gel se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en el sistema de documentación Infinity 1000/26MX Xpress (Vilber Lourmat, Germany). Antes de secuenciar, los productos de PCR se purificaron con ExoSAP-IT (Affymetrix, USA), según las instrucciones del fabricante. La reacción de secuenciación se preparó usando Big Dye Terminator v3.0 (Applied Biosystems, USA), y los fragmentos se resolvieron por electroforesis capilar en un analizador Genético de DNA Modelo 3730 (Applied Biosystems, USA). Las regiones correspondientes a ambas secuencias fueron ensambladas y editadas con el software BIOEDIT v7.2.0 (Hall, 1999). Las secuencias de consenso de cada aislado se compararon con las de la base de datos GenBank, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), con la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

Fungicidas

Como fuente de ingrediente activo de metil-tiofanato e iprodiona se usaron los fungicidas Cercobin M[®] (79 % de ingrediente activo, BASF Mexicana, Zapopan, Jalisco, Mexico) y Rovral 50 PH[®] (50 % ingrediente activa, Bayer Crop Science en Mexico, DF), respectivamente.

Pruebas de inhibición de crecimiento de micelial

El medio de cultivo PDA se preparó y mantuvo en baño de María a 60 °C hasta su uso. Por separado se preparó una solución madre de 10 000 µg mL⁻¹ IA de cada fungicida y se hicieron diluciones seriales de 1:10, 1:100 and 1:1000 en frascos estériles de 250 mL. La proporción apropiada de cada una de estas diluciones se mezcló con el medio PDA para obtener las concentraciones finales del fungicida: 0, 0.1, 0.5, 1, 10, 50 y 100 µg mL⁻¹ para iprodiona, y 0, 0.1, 1, 0, 100, 1000 y 2000 µg mL⁻¹ de IA para metil-tiofanato. Aproximadamente 10 mL de los medios enmendados con el fungicida se vertieron en placas de Petri de 60 x 0.5 mm.

Desde los márgenes de las colonias de 5 d, discos de micelio de 0.5 cm en diámetro se colocaron en el centro de cuatro placas de Petri de 6 cm que contenían medio de cultivo enmendado con los fungicidas. Estas placas se sellaron con Parafilm[®], colocadas en bolsas de Ziploc[®] e incubadas en la oscuridad a temperatura del laboratorio (22±2 °C) por 72 h. Después se midió el diámetro de las colonias en dos direcciones para cada una de las dosis probadas y promediadas. La mediana del crecimiento de micelio (mm) de cada aislado probado en las cuatro repeticiones se tomó y se usó para calcular el crecimiento relativo en relación

Colonies from 8- to 10-day-old cultures were used to prepare a conidial suspension (1×10^3 conidia mL^{-1}) with sterile distilled water. From this suspension, 0.1 mL was placed in a Petri dish with culture medium + fungicide for each concentration and incubated in the dark for 14 h. After incubation, the numbers of germinated and non-germinated conidia were counted in a sample of 100 conidia in the visual field of a microscope (Carl Zeiss, Germany) at 40 x magnification for each concentration. A conidium was considered germinated when the germ tube length was equal to or greater than three times its width (Yourman and Jeffers, 1999). As in the mycelial growth assay, four replicates were used for each dose of fungicide-isolate combination. Using these data, the conidial germination relative to on the plates not amended with fungicide was calculated. This assay was performed twice.

Data analysis

From these data, the effective dose that inhibited 50 % (EC_{50}) of the mycelial growth or conidial germination was estimated by adjusting the log-logistic model with an upper asymptote to the data using the procedure NLMIXED SAS (ver. 9.2) for each of the tested isolates. This model is expressed as follows:

$$y = \frac{\alpha}{\left(1 + \exp\left(\beta \log\left(\frac{Dose}{EC_{50}}\right)\right)\right)}$$

where y is the relative growth of mycelium or conidial germination, α is the upper asymptote (maximum possible value of y), β is the slope of the curve at the inflection point, and EC_{50} is the dose at which the relative growth/conidial germination is reduced by 50 % (Schabenberger and Pierce, 2002; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). This model is a re-parameterization of the log-logistic model in terms of EC_{50} (Schabenberger and Pierce, 2002). The starting values of the parameters for the iterations were assigned arbitrarily. Because not all of the starting values resulted in convergence for every isolate, different sets of starting values were used to achieve convergence. The pattern of residuals served as an indicator of the model's goodness of fit (Rebollar-Alviter *et al.*, 2007).

Sensitivity distribution

Box plots and histograms of the EC_{50} values were used to illustrate the sensitivity distribution of mycelium growth and conidial germination. The estimated moments and normality tests were obtained using the SAS Proc Univariate (ver. 9.2).

a la mediana de crecimiento de micelio en las placas no adicionadas con fungicidas por cada una de las concentraciones. Los medios de crecimiento de micelio se usaron para estimar la dosis efectiva de 50 (CE_{50}). La prueba se realizó dos veces.

Pruebas de inhibición de la germinación conidial

Las mismas concentraciones de fungicida usadas para las pruebas de crecimiento de micelio se evaluaron en el medio de agua de agar. Colonias de 8 a 10 d de cultivo se usaron para preparar una suspensión conidial (1×10^3 conidios mL^{-1}) en destilada estéril. De esta suspensión, 0.1 mL se colocó en una placa de Petri con el medio de cultivo + fungicida para cada concentración e incubado en la oscuridad por 14 h. Después se contaron los números de conidios germinados y no germinados en una muestra de 100 conidios en el campo visual del microscopio (Carl Zeiss, Germany) con magnificación de 40x para cada concentración. Un conidio se consideró germinado cuando el largo del tubo de germinativo fue igual o mayor que tres veces su ancho (Yourman and Jeffers, 1999). Tal como en las pruebas de crecimiento micelial, se usaron cuatro repeticiones para cada dosis de la combinación de fungicida-aislado. Con estos datos, calculó la germinación conidial relativa a las placas no enmendadas con fungicida. La prueba se realizó dos veces.

Análisis de datos

Con estos datos se estimó la dosis efectiva que inhibió el 50 % (CE_{50}) de crecimiento de micelio o la germinación conidial ajustando a los datos el modelo log-logístico con asíntota superior usando el procedimiento NLMIXED SAS (ver. 9.2) para cada uno de los aislados probados. El modelo se expresa así:

$$y = \frac{\alpha}{\left(1 + \exp\left(\beta \log\left(\frac{Dose}{EC_{50}}\right)\right)\right)}$$

donde "y" es el crecimiento relativo de micelio o germinación conidial, α es la asíntota superior (valor más alto posible de y), β es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, y CE_{50} es la dosis a la cual el crecimiento relativo/germinación conidial se reduce en 50 % (Schabenberger and Pierce, 2002; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). Este modelo es una re-parametrización del modelo log-logístico en términos de CE_{50} (Schabenberger and Pierce, 2002). Los valores de inicio de los parámetros en las iteraciones se asignaron arbitrariamente. Puesto que no todos los valores de inicio resultaron en convergencia para cada aislado, diferentes grupos de valores fueron usados para lograr convergencia. El

The data were diagnosed to check for the presence of outliers in the distribution. A log₁₀ transformation was applied to the data to achieve normality when possible. If, after performing the transformation, the data did not fit into a normal distribution, the extreme values were removed to estimate the parameters of interest but were kept to illustrate the distribution.

To determine any significant differences between the sensitivity of the isolates from both of the sampling areas, the sensitivity distributions in the conidia and mycelium of each fungicide in each studied region were evaluated by comparing the EC₅₀ distribution using the Kolmogorov-Smirnov test for two populations with the SAS Procedure NPAR1WAY (ver. 9.2).

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological and phylogenetic identification

The samples were used for the identification of isolates from two strawberry-producing regions in Michoacan corresponded to *B. cinerea*. The sequences of the amplification products of the ITS region of ribosomal DNA from eight isolates as obtained by PCR showed 100 % identity to the sequences in GenBank (accessions EU128648 and EU128649).

Sensitivity of *Botrytis cinerea* to iprodione

The sensitivity distribution of the mycelium to iprodione was bimodal (Figure 1A) and did not adjust to a normal distribution after the Log₁₀ transformation, ranging from 3 µg mL⁻¹ to 0.21 µg mL⁻¹ with a median of 0.74 µg mL⁻¹, while that of the conidia ranged from 0.47 µg mL⁻¹ to 22.59 µg mL⁻¹ with a median of 3.73 µg mL⁻¹, similar to those results reported by Chen *et al.* (2011). However, to determine whether the sensitivity distributions in mycelia in the two study areas were different given the bimodal behavior, the datasets were analyzed separately. The statistical comparisons using the Kolmogorov-Smirnov 2-sample test of the sensitivity distributions of *B. cinerea* mycelium in both of the study regions indicated significant differences ($p \leq 0.001$, $K_s = 3.44$) between the Zamora-Jacona and Maravatío valleys. In contrast, the distributions of conidia from both of the sampling areas were normal (Log₁₀ EC₅₀) and did not show significant differences (Figure 1B); therefore, the data from the two areas were pooled together. The sensitivity of mycelium from the Maravatío Valley isolates ranged

patrón de residuales sirvió como un indicador de la bondad de ajuste del modelo (Rebollar-Alviter *et al.*, 2007).

Distribución de la sensibilidad

Diagramas de caja e histogramas de los valores de CE₅₀ se usaron para ilustrar la distribución de la sensibilidad del crecimiento de micelio y germinación conidial. Los momentos estimados y pruebas de normalidad se obtuvieron con el Procedimiento Univariate de SAS (ver. 9.2). Los datos fueron diagnosticados para verificar la presencia de valores atípicos en la distribución. Se aplicó la transformación log₁₀ a los datos para lograr la normalidad donde posible. Si después de hacer la transformación, los datos no se ajustaban a una distribución normal, se eliminaron valores extremos para estimar los parámetros de interés, pero se mantuvieron para ilustrar la distribución.

Para determinar cualquier diferencia significativa entre la sensibilidad de aislados de las dos áreas de muestreo, la distribución de la sensibilidad en conidios y micelio de cada fungicida en cada región de estudio se evaluó comparando la distribución de las CE₅₀ usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos poblaciones con el Procedimiento NPAR1WAY de SAS (ver. 9.2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica y filogenética

Las muestras usadas para la identificación de los aislados de las dos regiones productoras de fresas en Michoacán correspondieron a *B. cinerea*. Las secuencias de la amplificación de productos en la región ITS de ADN ribosómico de ocho aislados obtenido por PCR, mostraron un 100 % de identidad con las secuencias en GenBank (accessions EU128648 and EU128649).

Sensibilidad de *Botrytis cinerea* a iprodiona

La distribución de la sensibilidad de micelio a iprodiona fue bimodal (Figura 1A) y no se ajustó a una distribución normal después de la transformación a Log₁₀, variando de 3 µg mL⁻¹ a 0.21 µg mL⁻¹ con una mediana de 0.74 µg mL⁻¹, mientras que en conidios varió de 0.47 µg mL⁻¹ a 22.59 µg mL⁻¹ con una mediana de 3.73 µg mL⁻¹, similar a los resultados reportado por Chen *et al.* (2011). Sin embargo, para determinar si la sensibilidad en las dos áreas de estudio fue diferente dado el comportamiento bimodal, los conjuntos de datos fueron analizados por separa-

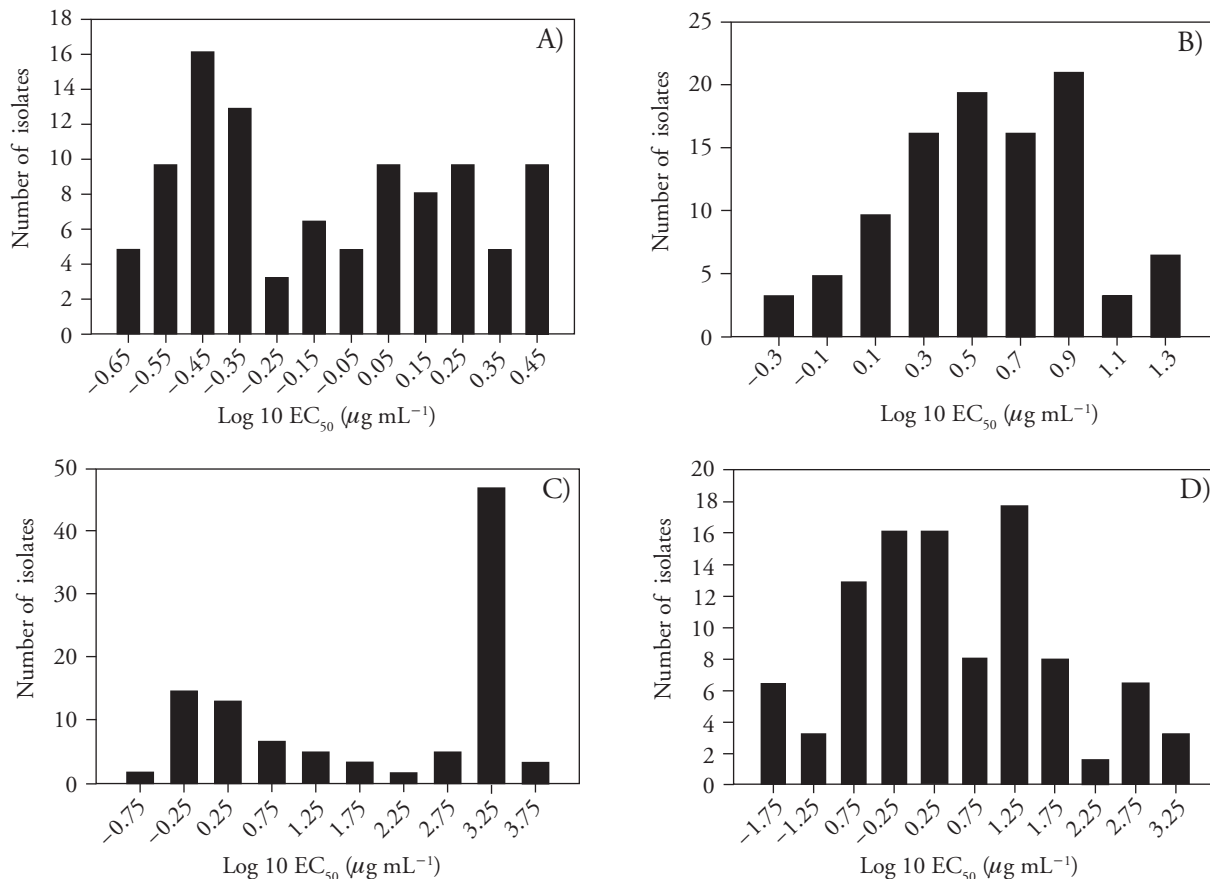


Figure 1. Sensitivity distribution ($\log_{10} EC_{50}$) of *B. cinerea* isolates (N=62) from two strawberry-producing areas in Michoacan, Mexico. A) Iprodione sensitivity distribution based on mycelium, B) iprodione sensitivity distribution based on conidial germination, C) thiophanate-methyl sensitivity distribution based on mycelial growth, and D) thiophanate-methyl sensitivity distribution based on conidial germination.

Figura 1. Distribución de la sensibilidad ($\log_{10} CE_{50}$) de aislados de *B. cinerea* (N=62) de dos áreas productoras de fresa en Michoacán, México. A) Distribución de la sensibilidad a iprodiona basada en micelio, B) distribución de la sensibilidad a iprodiona basada en germinación de conidios, C) distribución de la sensibilidad a metil-tiofanato basada en crecimiento de micelio, y D) distribución de sensibilidad a metil-tiofanato basada en germinación conidial.

from 0.23 to 0.89 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a median of 0.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, whereas that from the Zamora-Jacona Valley isolates ranged from 0.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a median of 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, indicating that the latter was almost 5 times less sensitive than were those from Maravatío Valley. Myresiotis (2007) obtained an EC_{50} in a range between 0.1 to 1.42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and considered resistant those isolates with an $EC_{50} \geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Banno *et al.* (2008) reported as sensitive those isolates with an $EC_{50} < 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ and reported different degrees of resistance associated with different mutations in those isolates with an $EC_{50} > 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Grabke *et al.* (2013) used discriminatory doses of 5 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to detect

do. Las comparaciones estadísticas por la prueba de Kolmogorov-Smirnov para 2 muestras de las distribuciones de sensibilidad del micelio en *B. cinerea* en ambas regiones de estudio, indicó diferencias significativas ($p \leq 0.001$, $K_s = 3.44$) entre los valles Zamora-Jacona y Maravatío. En cambio, las distribuciones de la sensibilidad en conidios para ambas áreas de muestreo fueron normales ($\log_{10} CE_{50}$) y no mostraron ninguna diferencia significativa (Figura 1B). Por lo tanto, los datos de las dos áreas fueron analizados en conjunto. La sensibilidad de micelio de los aislados del Valle de Maravatío varió de 0.23 a 0.89 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con una mediana de 0.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras la sensibilidad de aquellos del Valle de Zamora-Jacona varió de 0.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a

isolates that were highly susceptible, susceptible, moderately resistant and highly resistant, as evaluated using the germ tube length of the conidia. The isolates with low levels of resistance occurred at the highest frequency and were mainly associated with the mutations I365S and I365N of the gene *bos1*. Based on the studies of Banno *et al.* (2008) carried out on mycelium, 46 % of Maravatío Valley isolates and 94 % of those from Zamora-Jacona Valley would be considered resistant to iprodione. However, no genotyping studies were performed to confirm the presence of specific point mutations.

The iprodione sensitivity distribution of *B. cinerea* in the conidial germination assays showed a wide distribution of EC_{50} values. The sensitivity ranged from 0.47 to 22.60 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Grabke *et al.* (2013) and Amiri *et al.* (2013) considered isolates to be moderately resistant to resistant if they grew under iprodione concentrations greater than 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($EC_{50} > 5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Based on these results, 45 % of the isolates from both of the study areas have some degree of resistance. Analyzing data from the sampling areas separately, 36 % of the isolates from Maravatío Valley were resistant, while 53 % of the isolates from Zamora-Jacona Valley exceeded the indicated discriminatory dose, confirming again that isolates from this area tend to be more tolerant to the tested fungicides based on bioassays in both the conidia and mycelia.

The isolates from Zamora-Jacona Valley were less sensitive to iprodione than were those from Maravatío Valley. These results can be partly explained by the advancement of technology in both areas, which may be related not only to the number of fungicide applications per season (15 to 20) but also to the intrinsic biological aspects of the populations of the pathogen in that area. In contrast, Maravatío Valley is an area of low technology that is undeveloped and without ongoing technical assistance for strawberry producers, who grow strawberry mainly for national and local markets. It is likely that under these conditions, pathogens are subject to lower selective pressures than under the conditions of the Zamora-Jacona Valley.

Sensitivity of *Botrytis cinerea* to thiophanate-methyl

The sensitivity distribution of *B. cinerea* based on mycelial growth was clearly bimodal (Figure

3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con una mediana de 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el cual indica que el último fue casi 5 veces menos sensible que los del Valle Maravatío. Myresiotis (2007) obtuvo una CE_{50} en el rango de 0.1 a 1.42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se consideró resistentes aquellos aislados con una $CE_{50} \geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Banno *et al.* (2008) reportaron como susceptibles los aislados con una $CE_{50} < 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ y reportó diferentes grados de resistencia asociados con mutaciones diferentes en los aislados con un $CE_{50} > 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Grabke *et al.* (2013) usó dosis discriminatorias de 5 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para detectar aquellos aislados altamente susceptibles, susceptibles, moderadamente resistentes y altamente resistente, según lo evaluado usando la longitud del tubo germinativo de conidios. Los aislados con bajos niveles de resistencia fueron los más frecuentes se asociaron principalmente con las mutaciones I365S y I365N del gen *bos1*. Con base en los estudios de Banno *et al.* (2008) realizados en micelio, 46 % de los aislados del Valle de Maravatío y 94 % de los del Valle de Zamora-Jacona serían considerados resistentes a iprodiona. Sin embargo, no se realizó ningún estudio de genotipificación para confirmar la presencia de mutaciones de punto específico.

La distribución de la sensibilidad de *B. cinerea* a iprodiona en el ensayo de germinación conidial mostró una distribución amplia de valores de CE_{50} . La sensibilidad varió de 0.47 a 22.60 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Grabke *et al.* (2013) y Amiri *et al.* (2013) consideraron que los aislados fueron moderadamente resistente a resistente si crecieron a concentraciones de iprodiona superiores a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($CE_{50} > 5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Con base en estos resultados, 45 % de estos aislados de ambas áreas de estudio tienen algún grado de resistencia, mientras 53 % de los aislados del Valle de Zamora-Jacona excedieron la dosis discriminatoria indicada, confirmando que los aislados de esta área tienden a ser más tolerantes a los fungicidas probados, basado en los bioensayos de conidios y micelio.

Los aislados del Valle de Zamora-Jacona fueron menos susceptibles a iprodiona que aquellos del Valle de Maravatío. Estos resultados se pueden explicar parcialmente por el avance tecnológico de ambas áreas, lo cual puede estar relacionado no solo al número de aplicaciones de fungicidas por ciclo (15 a 20) sino también a los aspectos biológicos intrínsecos de las poblaciones de patógenos en esa área. En contraste, el Valle de Maravatío es un área de baja tecnología poco desarrollada y sin asistencia técnicas continua para los productores de fresa, quienes

1C), separating the two areas of study with the highest frequency of isolates at both ends of the distribution (Figure 2C). In contrast, the sensitivity distribution based on conidial germination was adjusted to a normal distribution when considering both of the study areas. The data from comparing the thiophanate-methyl sensitivity distributions of mycelium between the two study areas indicated that these areas were significantly different ($p \leq 0.002$, $K_s = 1.86$) and that the median EC_{50} from Zamora-Jacona Valley was almost 667 times that from Maravatío Valley. However, there were no significant differences ($p = 0.13$, $K_s = 1.17$) between the sensitivity distributions of the conidia, although the median

cultivan principalmente para mercados nacionales y locales. Bajo estas condiciones, es probable que los patógenos estén sujetos a menos presión de selección que bajo las condiciones del Valle de Zamora-Jacona.

Sensibilidad de *Botrytis cinerea* a metil-tiofanato

La distribución de la sensibilidad de *B. cinerea* basada en crecimiento de micelio fue claramente bimodal (Figura 1C), separando las dos áreas de estudio con la frecuencia más alta de aislados a cada lado de la distribución (Figura 2C). En cambio, la distribución de sensibilidad basada en germinación conidial se ajustó a una distribución normal, considerando

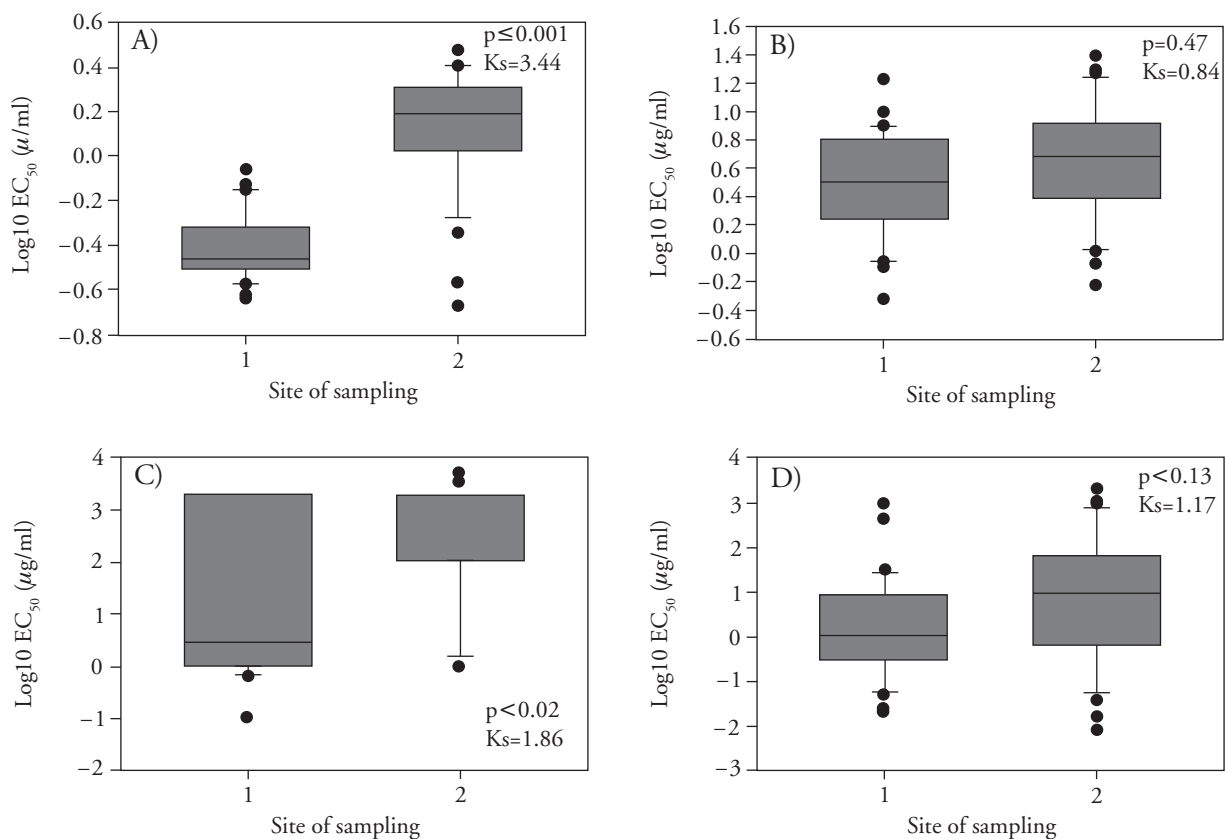


Figure 2. Sensitivity distribution of *Botrytis cinerea* isolates from two strawberry-producing areas (1=Maravatío Valley, n=30; 2=Zamora-Jacona Valley, n=32) in Michoacan, Mexico. A) Iprodione sensitivity distribution of mycelium, B) iprodione sensitivity distribution of conidia, C) thiophanate-methyl sensitivity distribution of mycelium, and D) thiophanate-methyl sensitivity distribution of conidia. Within each figure, the Kolmogorov-Smirnov p-value and test statistic from two independent samples is shown.

Figura 2. Distribución de la sensibilidad de aislados de *Botrytis cinerea* de dos áreas productoras de fresa (1. Valle de Maravatío, n= 30; 2. Valle Zamora-Jacona, n=32) en Michoacán, México. A) Distribución de la sensibilidad de micelio a Iprodiona, B) distribución de la sensibilidad de conidios a iprodiona, C) Distribución de la sensibilidad de micelio a metil-tiofanato, y D) Distribución de la sensibilidad de conidios a metil-tiofanato. En cada figura se muestra el valor-p y el estadístico de prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras independientes.

was 9 times higher in the valley of Zamora-Jacona, partly indicating the lack of correlation between the sensitivities of the conidia and mycelium with this group of fungicides. Fungal mycelia growth shows the greatest sensitivity to benzimidazole fungicides than does the germination of conidia (Leroux, 2007).

Due to the bimodal shape of the histogram, a mycelium-based analysis was performed for both sampling areas separately. The mycelium sensitivity distribution of the Maravatío Valley isolates was dispersed (Figure 2C), with EC_{50} values ranging from 0.11 to $> 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ with a median of $3.11 \mu\text{g mL}^{-1}$. This distribution was not normal, even after the removal of outliers and after the log10 transformation. The distribution of the Zamora-Jacona Valley isolates was also dispersed, with EC_{50} values ranging from 0.82 to $> 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ with a median of $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ without fitting to a normal distribution after the log10 transformation.

The distribution of the conidial EC_{50} values, considering isolates from the sampling areas, ranged from 0.01 to greater than $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ with a median of $2.01 \mu\text{g mL}^{-1}$. In Maravatío Valley, the distribution ranged from 0.02 to $892 \mu\text{g mL}^{-1}$ with a median of $1.13 \mu\text{g mL}^{-1}$, whereas in the Zamora-Jacona Valley, the values were more scattered, ranging from 0.01 to $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ with a median of $9.7 \mu\text{g mL}^{-1}$, which is 9 times greater than the median EC_{50} of the Maravatío Valley isolates. In both the conidial and mycelial assays, the EC_{50} values of the Zamora-Jacona Valley isolates exceeded those of the Maravatío Valley isolates.

The data indicate a high level of *B. cinerea* resistance to thiophanate-methyl in both of the strawberry-producing areas, but this resistance was significantly higher in the Zamora-Jacona Valley isolates than in the Maravatío Valley isolates. In both areas, the use of benzimidazole fungicides, especially thiabendazole, benomyl and thiophanate-methyl, on a calendar basis is common.

Studies defining the base line sensitivity of mycelium to *B. cinerea* showed that isolates with EC_{50} values greater than $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ are resistant (Luck and Guilling, 1995; LaMondia and Douglas, 1997; Yourman and Jeffers, 1999). Based on this criterion, 81 % of the Zamora-Jacona Valley isolates were resistant, whereas 34 % of the Maravatío Valley isolates fell into this category. Using a discriminatory dose of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, Mercier *et al.* (2010) found that

ambas áreas de estudio. Los datos de la comparación entre las distribuciones de sensibilidad de micelio a metil-tiofanato entre las dos áreas de estudio indicaron que estas áreas fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.002$, $K_s=1.86$) y que la mediana de la CE_{50} del Valle de Zamora-Jacona fue casi 667 veces mayor que la del Valle de Maravatío. Sin embargo, no hubo ninguna diferencia significativa ($p=0.13$, $K_s=1.17$) entre las distribuciones de sensibilidad de conidios, aunque la mediana fue 9 veces más alta que en el Valle de Zamora-Jacona, en parte indicando la falta de correlación entre las sensibilidades basados en conidia y micelio en este grupo de fungicidas. El crecimiento micelial muestra más sensibilidad a fungicidas de benzimidazoa que la germinación de conidios (Leroux, 2007).

Debido a la forma bimodal del histograma, se realizó un análisis basado en micelio para ambas áreas de muestreo por separado. La distribución de la sensibilidad a micelio de aislados del Valle de Maravatío fue dispersa (Figura 2C) con valores de CE_{50} que variaron de 0.11 to $> 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ con una mediana de $3.11 \mu\text{g mL}^{-1}$. La distribución no fue normal, aun después de la eliminación de valores atípicos y después de la transformación a log10. La distribución de los aislados del Valle de Zamora-Jacona también fue dispersa con valores CE_{50} variando de 0.82 to $> 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ con una mediana de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ sin ajustar a la distribución normal después de la transformación de log10.

La distribución de valores conidiales CE_{50} , considerando los aislados de las áreas de muestreo, varió de 0.01 a más que $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ con una mediana de $2.01 \mu\text{g mL}^{-1}$. En el Valle de Maravatío, la distribución varió de 0.02 a $892 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un mediana de $1.13 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras en el Valle de Zamora-Jacona, los valores fueron más dispersos, en un rango de 0.01 a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ con una mediana de $9.7 \mu\text{g mL}^{-1}$, el cual fue 9 veces más que la mediana de la CE_{50} de los aislados del Valle de Maravatío. En ambas pruebas de conidios y micelio, los valores de la CE_{50} de los aislados del Valle de Zamora-Jacona excedieron los de los aislados del Valle de Maravatío.

Los datos indican un alto nivel de resistencia de *B. cinerea* a metil-tiofanato en ambas áreas productoras de fresa, pero esta resistencia fue significativamente más alta en los aislados del Valle de Zamora-Jacona que en los aislados del Valle de Maravatío. En ambas áreas es común el uso de fungicidas benzimidazoles,

92 % of the isolates were resistant to thiophanate-methyl in strawberry fields in Oxnard, California. Based on studies of conidial germ tube elongation, Weber and Hahn (2011) considered isolates to be moderately resistant with an EC_{50} of 4.67 to $16.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ and resistant with an EC_{50} greater than $28 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fernández-Ortuño and Shnabel (2012), applying a discriminatory dose of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, found that 85 % of strawberry isolates from South Carolina were resistant to thiophanate-methyl, similar to the results of our study. All of the isolates characterized by Fernández-Ortuño and Shnabel (2012) as resistant, expressed the E198A (alanine to glutamate at position 198) point mutation.

Benzimidazole fungicides have a greater effect on mycelial growth than on conidial germination, associated with the distortion of germ tubes, which is an indicator of the disruption of cellular microtubules (Davidse and Ishii, 1995; Leroux, 2007). It is likely that these mutations are widely distributed in both of the examined areas in Mexico, but genotyping studies have not yet been performed.

Our data revealed the existence of *B. cinerea* populations that are resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in two of the most important strawberry-producing areas of Mexico with contrasting socio-economic and technological conditions. Data from sensitivity studies in both of the sample areas show that isolates from Zamora-Jacona Valley had the highest frequency of resistance to both fungicides, especially to thiophanate-methyl.

CONCLUSIONS

Resistance of *B. cinerea* to thiophanate-methyl and iprodione is widely distributed in the strawberry-producing areas in Michoacan, with differences in sensitivity between the isolates from both areas; the sensitivity was more marked with the thiophanate-methyl fungicide. As shown by separate analyses of the two study areas, the Zamora-Jacona Valley isolates were more resistant than were those from Maravatio Valley. These results will contribute to the establishment of integrated disease management programs of gray mold of strawberry and serve as the basis for implementing anti-resistance strategies for dicarboximide and benzimidazole fungicides.

especialmente tiabendazol, benomil y metil-tiofanato basado en el calendario.

Estudios que definen la línea base de sensibilidad de micelio en *B. cinerea* mostraron que aislados con valores de CE_{50} superiores a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ son resistentes (Luck and Guilling, 1995; LaMondia and Douglas, 1997; Yourman and Jeffers, 1999). Con base en este criterio, 81% de los aislados del Valle de Zamora-Jacona fueron resistentes, mientras 34 % de los aislados del Valle de Maravatio terminaron en esta categoría. Con una dosis discriminatoria de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, Mercier *et al.* (2010) encontraron que 92 % de los aislados fueron resistentes a metil-tiofanato en campos de fresa en Oxnard, California. Basado en estudios de elongación del tubo germinativo en conidios, Weber y Hahn (2011) consideraron que los aislados fueron moderadamente resistentes con un CE_{50} de 4.67 a $16.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y resistentes con un CE_{50} mayores a $28 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fernández-Ortuño and Shnabel (2012), aplicaron una dosis discriminatoria de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, y encontraron que 85 % de aislados de fresa de Carolina Sur fueron resistentes a tiofanato-metil, similar a los resultados de nuestro estudio. Todos los aislados caracterizados por Fernández-Ortuño y Shnabel (2012) como resistentes, expresaron la mutación puntual de E198A (cambio de alanina a glutamato en la posición 198).

Los fungicidas Benzimidazoles tienen un mayor efecto en crecimiento de micelio que en la germinación conidial, asociadas con la distorsión de tubos germinativos, el cual es un indicador de la disrupción de microtúbulos celulares (Davidse and Ishii, 1995; Leroux, 2007). Es probable que estas mutaciones tengan amplia distribución en ambas áreas examinadas en México, pero aún no se han realizado estudios de genotipificación.

Nuestros datos revelan la existencia de poblaciones de *B. cinerea* resistentes a fungicidas dicarboximidas y benzimidazoles en dos de las áreas más importantes para la producción de fresa en México, tienen condiciones socioeconómicas y tecnológicas contrastantes. Los datos de estudios de sensibilidad en ambas áreas de muestreo indicaron que los aislados del Valle de Zamora-Jacona tuvieron la frecuencia de resistencia más alta a ambas fungicidas, en especial a metil-tiofanato.

LITERATURA CITED

- Amiri, A., S. M. Heath, and N. A. Peres. 2013. Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. *Plant Dis.* 97: 393-401.
- Amiri, A., A. I. Zuniga, J. Mertely, and N. A. Peres. 2014. First report on resistance to pyraclostrobin, thiophanate-methyl, fenhexamid and boscalid in *Botrytis cinerea* from eucalyptus seedlings in Florida greenhouses. *Plant Dis.* 98: 851-851.
- Banno, S., F. Fukumori, A. Ichiishi, K. Okada, H. Uekusa, M. Kimura, and M. Fujimura. 2008. Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* 98: 397-404.
- Chen, F. P., X. L. Liu, X. P. Li, X. P., and G. Schnabel. 2011. First report of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* on blackberry from South Carolina. *Plant Dis.* 95: 1481.
- Cui, W., R. E. Beever, S. L. Parkes, P. L. Weeds, and M. D. Templeton. 2002. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genet. Biol.* 36: 187-198.
- Cui, W., R. E. Beever, S. L. Parkes, and M. D. Templeton. 2004. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. *Phytopathology* 94: 1129-1135.
- Davide, L. C., and H. Ishii. 1995. Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylcarbamates and N-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In: Lyr, H (ed). *Modern Selective Fungicides*. Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany. pp: 305-322.
- Elad, Y., P. Williamson, and N. Delen. 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Ed. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 403 p.
- Fernández-Ortuño, D., and G. Schnabel. 2012. First report of thiophanate-methyl resistance in *Botrytis cinerea* on strawberry from South Carolina. *Plant Dis.* 96: 1700.
- FRAC. 2008. FRAC Methods for monitoring fungicide resistance. *EPPO Bulletin* 21: 292-293.
- Grabke, A., D. Fernández-Ortuño, A. Amiri, L. Xingpeng, N. Peres, P. Smith, and G. Shnabel. 2014. Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology* 104: 396-402.
- Hall, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- LaMondia, J. A., and S. M. Douglas 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 81: 729-732.
- Lennox, C. L., and R. A. Spotts. 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 87: 645-649.
- Leroux, P., R. Fritz, D. Debieu, C. Albertini, C. Lanen, J. Bach, M. Gredt, and F. Chapeland. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in fieldstrains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* 58: 876-888.
- Leroux, P. 2007. Chemical Control of *Botrytis* and Its Resistance to Chemical Fungicides. In: Elad, Y., P. Williamson, and N.

CONCLUSIONES

La resistencia de *B. cinerea* a metil-tiofanato e iprodiona se distribuye ampliamente en las áreas productoras de fresa en Michoacán, con diferencias en sensibilidad entre los aislados de ambas áreas: la sensibilidad fue más marcada con el fungicida metil-tiofanato. Según lo mostrado por los análisis separados de dos áreas de estudio, los aislados del Valle Zamora-Jacona fueron más resistentes que los del Valle de Maravatio. Los resultados contribuirán a la creación de programas de manejo integrado del moho gris de la fresa y servir como base para implementar estrategias anti-resistencia para los fungicidas dicarboximidas y benzimidazole.

—Fin de la versión en Español—

---*---

- Delen (eds). *Botrytis: Biology, Pathology and Control* The Netherlands Springer. pp: 195-223.
- Li, Q., L. Y. Yan, L. Y. F. Tong, Z. L. Kong, W. Y. Hong, and H. Y. Li. 2007. Occurrence of iprodione-resistant *Botrytis cinerea* strain from strawberry in Zhejiang and possible molecular mechanism. *J. Fruit Sci.* 24: 344-348.
- Luck, J. E., and M. R. Guillings. 1995. Rapid identification of benomyl resistance strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycol. Res.* 99:1483-1488.
- Ma, Z. H., L. Y. Yan, Y. Luo, and T. J. Michailides. 2007. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88: 300-306.
- Medina, R., y M. Aguirre. 2004. El sistema fresa en México y Michoacán. In: Berdegue, J., y X. Sanclemente (eds). *La Fresa en Michoacán: Los retos del Mercado*. Gobierno del Estado de Michoacán-SEDAGRO y Consejo Estatal de la Fresa. pp: 21-31.
- Mercier, J., M. Kong, and F. Cook. 2010. Fungicide resistance among *Botrytis cinerea* isolates from California strawberry fields. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2010-0806-01-RS. www.plantmanagementnetwork.org/php/.
- Myresiotis, C. K., G. S. Karaoglanidis, and K. Tzavella-Klonari. 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 91: 407-413.
- Oshima, M., M. Fujimura, S. Banno, C. Hashimoto, T. Motoyama, A. Ichiishi, and I. Yamaguchi. 2002. A point mutation in the two component histidine kinase *BcOS-1* gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 92: 75-80.

- Oshima, M., S. Banno, K. Okada, T. Takeuchi, M. Kimura, A. Ichiishi, I. Yamaguchi, and M. Fujimura, M. 2006. Survey of mutations of a histidine kinase gene BcOS1 indicarboximide resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Plant Pathol. 72: 65-73.
- Rebollar-Alviter, A., L. V. Madden, S. N. Jeffers, and M. A. Ellis. 2007. Baseline and differential sensitivity to two QoI fungicides among isolates of *Phytophthora cactorum* that cause leather rot and crown rot on strawberry. Plant Dis. 91:1625-1637.
- Schanbenberger, O., and F. J. Pierce. 2002. Contemporary Statistical Models for the Plant and Soil Sciences. CRC Press, Boca Raton, FL. 725 p.
- SIAP, 2014. Producción Agropecuaria y Pesquera. (Acceso: diciembre 2014).
- Sánchez, R. G. 2008. El Cluster Agroindustrial de Zamora. La Red de Valor de Fresa. Fundación Produce Michoacán. Michoacán, México. 145 p.
- Sutton, J. C. 1998. Botrytis fruit rot Gray Mold and Blossom Blight. In: Mass J. L. (ed). Compendium of Strawberry Diseases. Second Edition. APS Press St. Paul Minnesota, USA. pp: 28-30.
- Weber, R. W. S. 2011. Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in Northern German small-fruit production. Plant Dis. 95: 1263-1269.
- Weber, R. W. S., and M. Hahn. 2011. A rapid and simple method for determining fungicide resistance in Botrytis. J. Plant Dis. Prot. 118: 17-25.
- Yarden, O., and T. Katan. 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlates with benomyl resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. Phytopathology 83:1478-1483.
- Yourman, L. F., and S. N. Jeffers. 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 83: 569-575.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput. Biol. 7: 203-214.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, California, USA, Academic Press. pp: 315-322.