Evaluación de la susceptibilidad de hongos endófitos aislados de rosa (*rosa hybrida)* a fungicidas comerciales

Evaluating susceptibility to commercial fungicides of endophytic fungi isolated from roses (*rosa hybrida)*

Ingrid Carolina Corredor Perilla[*], *María Caridad Cepero*[**], *Silvia Restrepo*[***]

RESUMEN

Los hongos endófitos han mostrado potencial como agentes de control biológico. Sin embargo, su aplicación en campos comerciales es aún limitada. En rosas, la continua aplicación de fungicidas en cultivos puede tener efectos deletéreos en el crecimiento de los endófitos. En este trabajo se evaluó la susceptibilidad de hongos endófitos aislados de *Rosa hybrida* a fungicidas utilizados comercialmente en el control de patógenos en el cultivo de rosa. Esto se realizó in vitro, mezclando diferentes concentraciones de fungicidas con medios estándares en el crecimiento de hongos endófitos y midiendo diariamente su crecimiento. La susceptibilidad de *Botrytis cinerea* (Cepa 3015), uno de los más importantes patógenos que afecta el cultivo de rosas en Colombia, se analizó de la misma forma. El 45,45% de los hongos endófitos evaluados demostraron susceptibilidad de crecimiento con grados de sensibilidad desde no sensibles (≥73,75%) hasta regularmente sensibles (≥48,75% - <61,25%) en las concentraciones evaluadas principalmente en fungicidas como boscalid, captan, iprodione y pyrimethanil. En el caso de fungicidas como carboxin más thiram, fludioxonil más ciprodinil, y prochloraz, se observaron grados de susceptibilidad de alta sensibilidad (<23,75%), inhibiendo totalmente el crecimiento de los hongos endófitos evaluados. En *B. cinerea* (Cepa 3015) se observó alta susceptibilidad a pyrimethanil, carboxin más thiram, fludioxonil más ciprodinil, y prochloraz. Aunque los controles de *B. cinerea* tuvieron mayores crecimientos, la mayoría de los crecimientos de los hongos endófitos evaluados en los medios enmendados en las dos concentraciones fueron superiores a los de este patógeno. El rango de susceptibilidad a fungicidas de hongos endófitos en las cepas 3002, 3003, 3004, 3005 y 3006 bajo los parámetros de análisis de este experimento, muestra su selección como hongos promisorios para programas de manejo integrado de plagas y enfermedades, teniendo en cuenta el momento, la frecuencia y la dosis de aplicación tanto de los fungicidas como de los hongos endófitos empleados.

Palabras clave: hongos endófitos, susceptibilidad, fungicidas, *Botrytis cinerea*, medios enmendados.

ABSTRACT

Fungal endophytes have shown their potential as biocontrol agents; however, their application in commercial fields remains limited. Continuously applying fungicides to crops (specifically to roses) may have harmful effects on endophyte growth. Endophytic fungi were isolated from *R. hybrida* and their susceptibility to fungicides regularly used for controlling important pathogens was analysed. This was performed *in vitro*, mixing several fungicide concentrations with standard medium for fungal endophytes;

* Microbióloga agrícola y veterinaria. Estudiante del programa de maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Micología y Fitopatología (LAMFU), Bogotá. D.C. carocorre@gmail.com

** M. Sc. Microbiología. Profesora Asociada, Universisdad de Los Andes, Bogotá. D.C. Tel:+571 3394949 ext. 2768. mcgarcia@uniandes.edu.co

*** Ph. D. Fitopatología. Profesora Asistente y directora del Laboratorio de Micología y Fitopatología Uniandes (LAMFU), Bogotá. D.C. srestrep@uniandes.edu.co.

growth inhibition was then measured. The susceptibility of *Botrytis cinerea* (3015 strain), one of the most important pathogens affecting roses in Colombia, was also assessed using the same protocols. Active ingredients, such as boscalid, captan, iprodione and pyrimethanyl, showed susceptibility ranging from not sensitive (≥73.75%) to regularly sensitive (≥48.75% - <61.25%) for 45.45% of the fungal endophytes assessed. Endophytic fungi were highly susceptible to fungicides such as pyrimethanyl, carboxin plus thiram, fludioxonyl plus ciprodinyl and prochloraz. *B. cinerea* (3015 strain) presented high susceptibility (<23.75%) to fungicides such as pyrimethanyl, carboxin and thiram, fludioxonil and ciprodinyl, prochloraz. Although *B. cinerea* showed the greatest growth in controls, the endophytic fungi being assessed grew better in different media with fungicides. The results revealed some of these fungal endophytes' potential for integrated pest management (IPM) in roses in Colombia (3002, 3003, 3004, 3005 and 3006 strains), taking into account correct application time, application frequency and both fungal endophyte and fungicide dosage which may greatly limit fungal endophyte growth.

Key words: Fungal endophytes, susceptibility, fungicides, *Botrytis* sp, enmended media.

Recibido: septiembre 29 de 2006 Aceptado: abril 30 de 2007.

INTRODUCCIÓN

Los hongos endófitos colonizan y crecen asintomáticamente dentro de los tejidos de plantas sin causar daño a sus hospederos. Éstos han sido ampliamente estudiados tanto en monocotiledóneas como en angiospermas leñosas (Arnold et ál., 2003; Schulz y Boyle, 2005). Según Hawksworth (1993, 2001) la gran mayoría de la diversidad de hongos no descritos se encuentran en las asociaciones hongo-planta tropical, siendo sus roles ecológicos y su diversidad casi enteramente desconocidos (Carroll, 1988; Lodge et ál., 1996; Arnold, 1999). La totalidad de asociaciones hasta el momento investigadas se han centrado en pastos de regiones templadas y en endófitos de la familia Clavicipitaceae (endófitos balansiales) (Clay y Schardl, 2002; Schulz y Boyle, 2005). Los hongos endófitos pueden estar situados a nivel intra o intercelularmente en diferentes partes de la planta (follaje, yemas y raíces) (Schulz y Boyle, 2005). Existen dos formas de transmisión de los endófitos: vertical (endófitos balansiales) y horizontal (endófitos no balansiales). Estos hongos son capaces de producir diversas clases de metabolitos, algunos con acciones herbicidas, fungicidas, antibacteriales y anticancerígenos, con variados usos en la industria y de utilidad para la humanidad (Azevedo et ál., 2000; Strobel, 2003; Schulz y Boyle, 2005). Además, el control de patógenos de importancia en la agricultura por medio de hongos endófitos ha sido reportado (Arnold et ál., 2003; Rubini et ál., 2005; Holmes et ál., 2004; Corrado et ál., 2004; Haugaard, 2002).

Una de las enfermedades de mayor prevalencia en cultivos de rosa en la sabana de Bogotá es el moho gris producido por el patógeno *Botrytis cinerea.* Esta enfermedad causa grandes pérdidas en diferentes cultivos (Garcés de Granada y Orozco de Amézquita, 2003). Los principales métodos de control para este patógeno se basan en la utilización de fungicidas con diferente modo de acción; así, ingredientes activos del grupo de las dicarboximidas (iprodione) actúan sobre la NADH citocromo c reductasa en la peroxidación de lípidos, los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (DMI) como los imidazoles (prochloraz), las anilinopirimidinas (AP) las cuales inhiben la biosíntesis de la metionina (ciprodinil y pyrimethanil), las carboximidas (boscalid y carboxin) que actúan sobre el complejo dos en la respiración fúngica (Succinato deshidrogenasa), los fungicidas fenilpirroles (PP) con acción sobre la proteína MAP kinasa en las señales de transducción osmótica (fludioxonil), y los ditiocarbamatos (thiram) y phthalimidas (captan) que tienen una actividad de contacto múltiple (FRAC, 2005). Una variedad de patógenos han mostrado diferentes niveles de riesgo a resistencias hacia estos fungicidas, tanto en campo como en el laboratorio (FRAC, 2005; Köller et ál., 2005; Petsikos-Payanotaou et ál., 2003). Las susceptibilidades a fungicidas evaluados sobre patógenos dependen en gran medida del uso correcto de éstos en las frecuencias, aplicaciones y dosis adecuadas en campo (Köhl et ál., 1998; Sergeeva et ál., 2001; Saladin et ál., 2003; Lupton et ál., 2005).

Se han realizado pocos estudios sobre resistencias a fungicidas por parte de hongos endófitos con potencial en control biológico. La mayoría de investigaciones se han enfocado en endófitos balansiales en los cuales se determinó que el tipo de transmisión de éstos es fundamental para la colonización de su hospedero y su éxito en la baja sensibilidad a fungicidas (Roberti et ál., 2006). Algunos estudios se han hecho en endófitos no balansiales, evaluando susceptibilidades de cepas endófitas de un patógeno de mango como *Colletotrichum gloeosporioides* (Ker-Chung, 2001). La evaluación in vitro para determinar grados de susceptibilidad a fungicidas es una de las metodologías más comunes para evaluar sensibilidades, aunque los resultados deben ser analizados con precaución ya que algunos de éstos no son equivalentes a los obtenidos en campo (Köller et ál., 2005; FRAC, 2005). Igualmente, se ha demostrado que en algunos organismos existe una serie de transportadores que actúan como mecanismos de detoxificación, y que posiblemente serían una de las causas por las cuales los hongos obtienen cierto grado de resistencia a algunos fungicidas específicos (Köller et ál., 2005; Schoonbeek et ál., 2001; Hayashi et ál., 2002; De Waard et ál., 2006).

Ante la necesidad de implementar métodos que permitan realizar un manejo integrado de plagas y enfermedades, y disminuir la utilización de fungicidas mediante el uso de hongos endófitos, en este trabajo se pretende evaluar la susceptibilidad de crecimiento de hongos endófitos aislados de *R. hybrida* in vitro, a ingredientes activos de fungicidas normalmente implementados para el control de hongos patógenos en cultivos de rosa. Así mismo, se pretende observar la susceptibilidad a esos mismos fungicidas en una cepa (3015) de *B. cinerea*, y hacer comparaciones de crecimiento con respecto a los hongos endófitos evaluados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de los hongos endófitos

A partir de las investigaciones realizadas por Salgado (2005) y Salgado y Cepero de García (2005) con base en aislamientos, identificación clásica y actividad antagónica de hongos endófitos de rosa de jardín, se seleccionaron aquellos aislamientos que produjeron halos de inhibición contra *B. cinerea* cepa (3015) (patógeno aislado de *R. hybrida*). Estos aislamientos fueron conservados en agua destilada estéril a temperatura ambiente para su posterior utilización (se encuentran disponibles en el Cepario de Micología LAMFU, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia) (tabla 1). Una descripción completa del aislamiento y la identificación de los hongos endófitos se encuentra en Salgado (2005) y Salgado y Cepero de García (2005).

Pruebas de susceptibilidad a diversos fungicidas de importancia para el control de *B. cinerea*

El patógeno aislado de rosa *B. cinerea* (micelio esporulado), y los once hongos endófitos (solo micelio) aislados de rosa de jardín, fueron sembrados en un medio estándar conocido como Agar Extracto de Malta Enriquecido (medio AME) (Arnold et ál., 2003; Salgado 2005; Salgado y Cepero de García, 2005), este medio contiene los siguientes compuestos, extracto de malta (2%), peptona (1%), glucosa (2%) y agar (1,7%). Para un óptimo crecimiento y activación de las cepas posteriormente fueron incubadas a una temperatura de 27 ºC en la oscuridad, durante 20 días con el fin de llevar a cabo las pruebas de sensibilidad a diversos fungicidas.

Tabla 1. Hongos endófitos seleccionados por su antagonismo in vitro contra *Botrytis cinerea*

Accesión Nº	Morfotipos/géneros
3002	Micelio estéril
3003	Micelio estéril
3004	Micelio estéril
3005	Micelio estéril
3006	*Alternaria* sp
3007	Micelio estéril
3008	Micelio estéril
3009	Micelio estéril
3010	Micelio estéril
3011	*Nigrospora* sp
3012	Micelio estéri

Hongos endófitos de rosa de jardín seleccionados por su antagonismo frente a *Botrytis cinerea* (Salgado, 2005). Cepario de Micología LAMFU, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron a partir de los doce hongos (endófitos y patógeno) activados en el medio estándar. Se colocaron discos (diámetro 0,7 mm) de los hongos extraídos del medio activado en medios sin enmendar (control) (AME) y medios enmendados (adición del ingrediente activo al medio de común crecimiento), evaluando para cada fungicida dos concentraciones. Estas dos concentraciones por ingrediente activo correspondieron a las de fungicidas aplicados en la precosecha del cultivo de la rosa en empresas de flores de la sabana de Bogotá (AME+C1), y a un 25% por encima de la concentraciones anteriormente mencionadas (AME+C2) (tabla 2).

Teniendo en cuenta el tiempo de crecimiento óptimo de los hongos endófitos, y el periodo de carencia de los ingredientes activos, se hicieron evaluaciones diarias por dieciséis días. Se estimaron los diámetros en cada uno de los tratamientos, y se determinaron las medias corregidas (corrigiendo el diámetro promedio de crecimiento del hongo en centímetros menos el diámetro del disco del hongo colocado en cada uno de los tratamientos incluyendo el control).

Los ingredientes activos evaluados en los medios enmendados fueron: boscalid 50% (Cantus®; Basfquímica, Colombia), captan 50% (Orthocide®; Proficol, Colombia), iprodione 50% (Rovral®; Bayer Crop Science, Colombia), pyrimethanil 40% (Scala®; Bayer Crop Science, Colombia), carboxin 20% más thiram 20% (Pro-Gro®; Proficol, Colombia), fludioxonil 25% más ciprodinil 37,5% (Switch®; Syngenta, Colombia), y prochloraz -1 y -2 45% (Mirage®; Proficol, Colombia y Sportak®; Bayer Crop Science, Colombia, este último proveniente de dos casas comerciales); estos ingredientes activos fueron escogidos por su extenso uso en el control de patógenos como *Botrytis* sp.

Se evaluaron en total ocho tratamientos, y se realizaron dieciséis repeticiones en el ensayo, haciendo valoraciones por triplicado con cada uno de los tratamientos.

Los fungicidas fueron adicionados a los tratamientos con medio enmendado luego de autoclavar el medio AME.

Los fungicidas (ingredientes activos) se mezclaron con el medio AME hasta la total disolución de los ingredientes activos al alcanzar este medio

Tabla 2. Concentraciones evaluadas de los ingredientes activos de cada fungicida en las dos concentraciones.

Ingrediente activo (i.a) (pureza de i.a en el fungicida (%))	**Concentración evaluada (µl/ml - µg/ml) [3]**	**Concentración 25% (por encima de la anteriormente evaluada) (µl/ml - µg/ml)**
Boscalid 50% (p/v)	200 µg/ml	250 µg/ml
Captan 50% (p/v)	600 µg/ml	750 µg/ml
Iprodione 50% (v/v)	0, 75 µl/ml	0, 9375 µl/ml
Pyrimethanil 40% (v/v)	0, 6 µl/ml	0, 75 µl/ml
Carboxin más Thiram 40% (p/v)	400 µg/ml	500 µg/ml
Fludioxonil más Ciprodinil 62, 5% (p/v)	375 µg/ml	468, 75 µg/ml
Prochloraz -1[1] 45 (p/v)	225 µg/ml	281, 25 µg/ml
Prochloraz-2[2] 45% (v/v)	0, 36 µl/ml	0, 45 µl/ml

[1] concentración evaluada del ingrediente activo de la casa comercial No. 1, [2] concentración evaluada del ingrediente activo de la casa comercial No. 2, [3] concentración evaluada del (µl/ml), ingrediente activo en presentación líquida. (µg/ml) concentración evaluada del ingrediente activo en presentación sólida

40 ºC de temperatura. Con respecto al control se agregó únicamente el medio AME en las cajas de Petri (volumen final por caja 25 ml). Éstas se llevaron a preincubar durante tres días (con el fin de asegurar esterilidad por manipulación), en condiciones de oscuridad, a temperatura ambiente para posteriormente realizar la prueba de susceptibilidad, colocando en la parte central de las cajas de Petri los discos de cada uno de los doce hongos, en cada uno de los tratamientos correspondientes, y llevándolos a incubar a una temperatura de 27 °C en oscuridad, midiendo los diámetros de crecimiento desde el día cero hasta el día dieciséis; el crecimiento se midió en forma de cruz, obteniendo un promedio de las dos medidas en cada réplica, y se estableció el área bajo la curva de crecimiento de la colonia (ABCCC) (Istafadah et ál., 2006) modificada del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCDE) (Olson, 2001):

$$(\mathrm{ABCCC}) = \sum_{i=1}^{n-1} \{(Y_{i+1}+Y_i)/2\}(t_{i+1}-t_i)$$

donde: ***Y*** es el radio de la colonia del hongo en el medio enmendado y ***t*** es el día de observación

Se utilizó el programa Statistix 8.0® (Analytical Software) para la evaluación de los diámetros de crecimiento realizando un análisis de varianza Anova (Wayne, 2002) de los datos transformados por los datos (ABCCC) obtenidos y, posteriormente, se realizó un análisis de comparación de medias de Tukey (α=0,05).

RESULTADOS

Al realizar Anova en las medias corregidas se obtuvieron diferencias significativas en las variables estudiadas (fungicida, hongo y tratamiento), y entre las interacciones analizadas (fungicida*hongo, fungicida*tratamiento, hongo*tratamiento, fungic ida*hongo*tratamiento) (tabla 3). Al efectuar las interacciones entre los tres tratamientos (AME, AME+C1 y AME+C2) se observaron diferencias significativas (Tukey α=0,05).

Susceptibilidad de los endófitos a fungicidas de uso común en el control de *Botyrtis cinerea* en el cultivo de la rosa

De acuerdo con los diámetros de crecimiento obtenidos se estableció una tabla categórica en la cual, conforme a la tasa de crecimiento de los hongos endófitos en las cajas de Petri (diámetro máximo corregido 8,0 cm, equivalente al 100% de crecimiento), se establecieron los niveles de sensibilidad (la susceptibilidad se estableció de acuerdo con el diámetro de crecimiento obtenido en los medios enmendados y comparándolo con el control) que se observan en la tabla 4.

Tabla 3. Anova para los logaritmos de área bajo la curva de los diámetros diarios de crecimiento de los once hongos endófitos evaluados y la cepa de *B. cinerea.*

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Fungicida	7	516,14	73,735	951,67	0,0001
Hongo	11	212,25	19,569	252,56	0,0001
Tratamiento	2	1466,69	733,347	9465,03	0,0001
Fungicida*Hongo	77	252,59	3,28	42,34	0,0001
Fungicida*Tratamiento	14	283,33	20,238	261,2	0,0001
Hongo*Tratamiento	22	56,18	2,553	32,96	0,0001
Fungicida*Hongo*Tratamiento	154	192,9	1,253	16,17	0,0001
Error	576	44,63	0,077		
Total	863	3027,72			

DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrados medios, F: valor de F calculado, P: probabilidad

Tabla 4. Tabla categórica para evaluar el grado de susceptibilidad

Diámetro de crecimiento	Equivalente en porcentaje	Nivel de sensibilidad
<1,9 cm	<23,75%	Altamente sensible
≥1,9 - < 2,9 cm	≥23,75% - <36,25%	Moderadamente sensible
≥2,9 - <3,9 cm	≥36,25% - <48,75%	Intermedio
≥3,9 - <4,9 cm	≥48,75% - <61,25%	Regularmente sensible
≥4,9 -< 5,9 cm	≥61,25% - <73,75%	Bajamente sensible
≥ 5,9 cm	≥73,75%	No sensible

En los análisis estadísticos realizados para evaluar las diferentes interacciones y relaciones entre las variables estudiadas se estableció que, de los once hongos endófitos analizados, sólo cinco (cepas 3002, 3003, 3004, 3005 y 3006) tuvieron las mejores medias de crecimiento en los fungicidas con principios activos como boscalid, captan, iprodione y pyrimethanil en las dos concentraciones consideradas, ya que los hongos endófitos restantes no tuvieron un crecimiento significativo en la mayoría de los fungicidas estudiados (por tanto, no fueron incluidos en el análisis). Contrario a lo anteriormente descrito en este estudio, el grado de sensibilidad de los hongos endófitos en fungicidas con principios activos como carboxin más thiram, ciprodinil más fludioxonil, prochloraz-1 y prochlraz-2 fue mayor para los once hongos endófitos evaluados.

Teniendo en cuenta el logaritmo de área bajo la curva de los crecimientos diarios, se hicieron comparaciones de medias de los dos tratamientos y el control, obteniéndose diferencias significativas a nivel estadístico (Tukey $\propto$=0,05) entre éstos. Se determinó que los controles en cada una de las evaluaciones realizadas fueron los que mayores medias obtuvieron, seguidos de los tratamientos con las concentraciones uno y, finalmente, los tratamientos con las concentraciones dos (tabla 5).

En las diferentes interacciones realizadas a nivel estadístico se observó que la cepa 3002 es el hongo que mayor media de crecimiento reportó frente a los demás hongos en los medios enmendados y sin enmendar (especialmente en boscalid, captan, iprodione, pyrimethanil y carboxin más thiram), alcanzándose además, in vitro, un grado de susceptibilidad que varió desde moderadamente sensible hasta no sensible. No obstante, en los otros medios enmendados (ciprodinil más fludioxonil, prochloraz-1 y procholraz-2) este hongo mostró ser altamente sensible (figuras 1 y 2).

El segundo hongo con una mayor media de crecimiento fue la cepa 3003, en donde el control con un 99,75% de crecimiento nunca fue alcanzado en medios enmendados con carboxin más thiram, prochloraz-1 y prochloraz-2, observándose por consiguiente una alta susceptibilidad a estos fungicidas. Contrario a esto, en ingredientes activos como boscalid, captan, iprodione, pyrimethanil y fludioxonil más ciprodinil se observaron susceptibilidades que van desde intermedio a moderadamente sensible (figuras 1 y 2).

Tabla 5. Comparaciones de medias de Tukey para los tratamientos

Tratamientos	Media	Grupos homogéneos
Control	4,0907	A
AME + C1	1,3967	B
AME + C2	1,2619	C

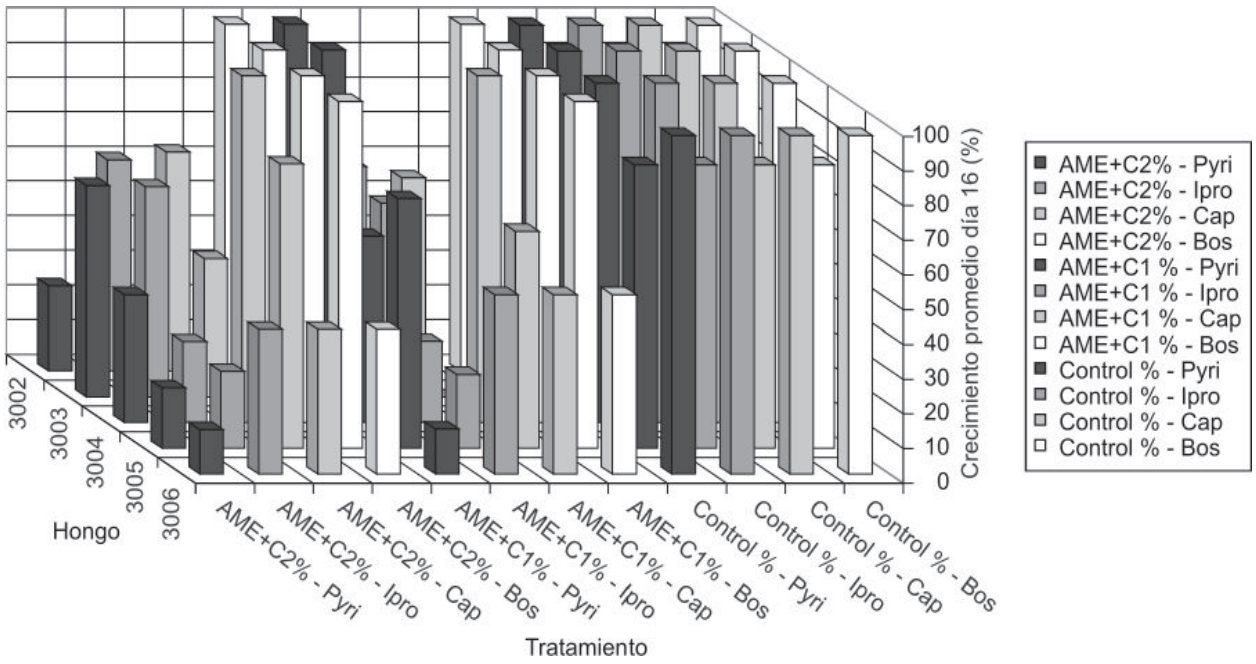

Figura 1. Susceptibilidad del crecimiento de los hongos endófitos con mayores diámetros en medios enmendados y no enmendados en el día 16.

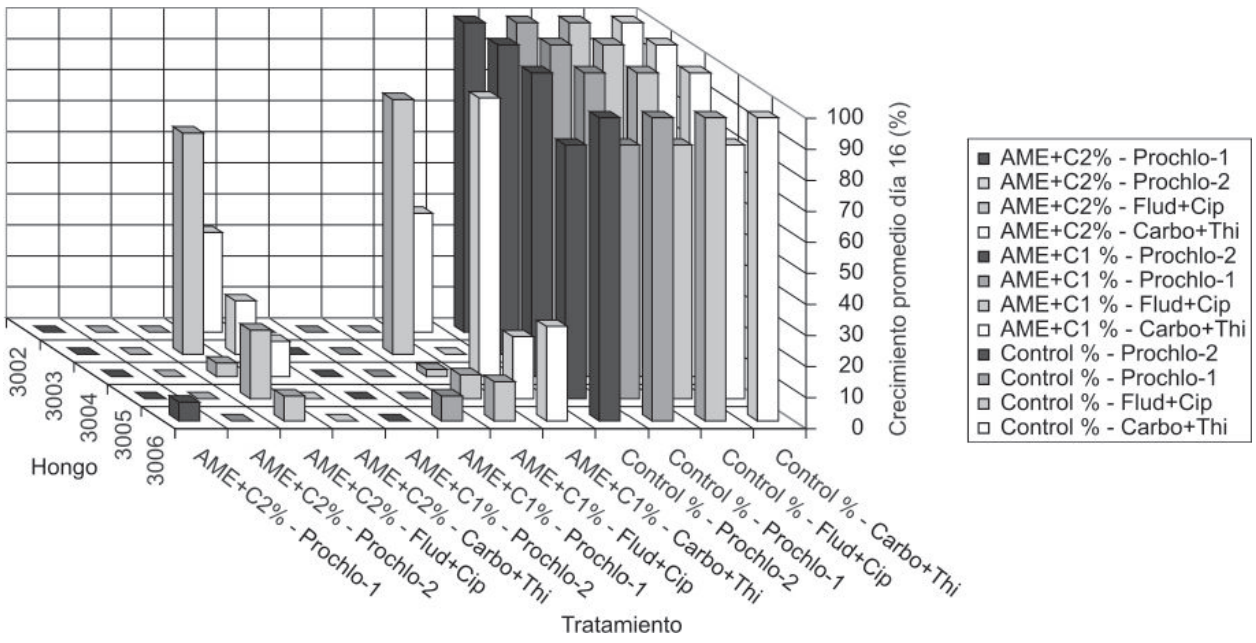

Figura 2. Susceptibilidad del crecimiento de los hongos endófitos con menores diámetros en medios enmendados y no enmendados en el día 16.

El tercer hongo con mayor media fue la cepa 3004, la cual obtuvo sus mejores crecimientos en boscalid, captan, pyrimethanil y en la concentración uno de carboxin más thiram con susceptibilidades que abarcan desde sensibilidades intermedias a no sensibles. Así mismo, los más bajos crecimientos obtenidos fueron en iprodione, fludioxonil más ciprodinil, prochloraz-1 y –2 alcanzando un nivel de susceptibilidad altamente sensible (figura 1 y 2).

En un cuarto lugar, la cepa 3005 demostró sus mejores crecimientos en medios enmendados con ingredientes activos como boscalid y captan, y en la concentración uno de pyrimethanil, obteniéndose grados de susceptibilidad desde bajamente sensibles hasta no sensibles. Por el contrario, una mayor susceptibilidad fue reportada en medios enmendados con ingredientes activos como iprodione, carboxin más thiram, fludioxonil más ciprodinil, prochloraz –1 y –2 (figuras 1 y 2).

Finalmente, en el quinto lugar obtenido respecto a medias, la cepa 3006 tuvo sus mejores crecimientos en medios enmendados con ingredientes activos como boscalid, captan, iprodione y carboxin más thiram, con susceptibilidades de grado moderadamente sensible a regularmente sensible. Todo lo contrario se notó en medios enmendados con ingredientes activos como pyrimethanil, fludioxonil más ciprodinil, prochloraz –1 y –2 con grados de susceptibilidad desde moderadamente sensible hasta altamente sensible (figuras 1 y 2).

Susceptibilidad de *Botrytis cinerea* a fungicidas de uso común para su control en el cultivo de la rosa

La cepa (3015) de *B. cinerea* utilizada en este estudio ocupó el quinto lugar por mayor media en las interacciones fungicida por hongo evaluadas, siendo altamente sensible a cinco de los siete principios activos evaluados (pyrimethanil, carboxin más thiram, fludioxonil más ciprodinil, prochloraz-1 y-2). A diferencia de lo observado en estos fungicidas, en el caso de ingredientes activos como boscalid, iprodione, y la concentración dos de captan, se obtuvieron grados de susceptibilidad desde intermedio a no sensible (figura 3).

Relación de crecimiento entre *B. cinerea* y hongos endófitos aislados de rosa de jardín en medios enmendados y sin enmendar

Teniendo en cuenta el diámetro promedio de crecimiento (cm) de *B. cinerea* (cepa 3015) con relación a los hongos endófitos en el día 16, se estimaron las diferencias en porcentaje para cada uno de los hongos (tablas 6 -10).

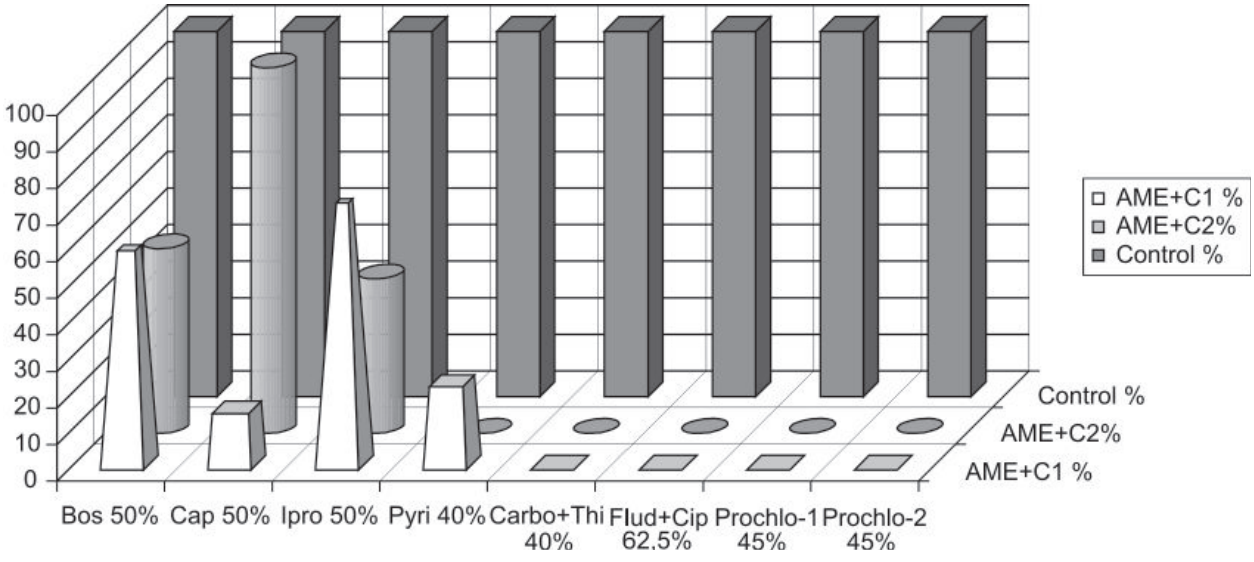

Figura 3. Susceptibilidad del crecimiento de *Botrytis cinerea* (cepa 3015) en medios enmendados y no enmendados en el día 16.

En la comparación mediante las diferencias obtenidas por porcentaje en el día 16 entre *B. cinerea* (cepa 3015) y la cepa 3002, se observó que los controles de *B. cinerea* alcanzaron un diámetro ligeramente superior en comparación con el diámetro alcanzado por este hongo; las diferencias obtenidas fueron del 0,13% (tabla 6).

Respecto a los tratamientos enmendados con la concentración uno, se denota claramente que la cepa 3002 tuvo mayores diámetros de crecimiento en ingredientes activos como boscalid, captan, pyrimethanil y carboxin más thiram, los cuales oscilaron desde 38,36% hasta el 77,63% (tabla 6).

En los tratamientos enmendados con la concentración dos en la cepa 3002 se obtuvieron también los mejores crecimientos en ingredientes activos como boscalid, iprodione, pyrimethanil y carboxin más thiram (18,63%-49,5%). Sin embargo, en concentraciones más altas de las normalmente usadas (AME+C1) *B. cinerea* (cepa 3015) alcanzó mejores crecimientos que la cepa 3002 en medios enmendados con captan (tabla 6).

Así mismo, concentraciones más altas evitan un mejor crecimiento de *B. cinerea* (cepa 3015) en ingredientes activos como iprodione. Finalmente, se confirma la eficacia de ingredientes activos como fludioxonil más ciprodinil, prochloraz –1 y –2 inhibiendo inclusive hasta el crecimiento de la cepa 3002 (tabla 6).

Al realizar las comparaciones entre *B. cinerea* (cepa 3015) y la cepa 3003, los controles mostraron la misma tendencia que en la relación comparativa anterior. *B. cinerea* tuvo un mayor crecimiento en medios enmendados como captan en la concentración uno y dos, y en iprodione en la concentración uno (tabla 7). En el caso de las concentraciones uno y dos en ingredientes activos como boscalid, pyrimethanil, fludioxonil más ciprodinil se observaron mejores crecimientos por parte del endófito (1,25%-82,13%) y (17,25%-71,36%) respectivamente (tabla 7). De igual manera, en la concentración dos de iprodione y carboxin más thiram hubo un mejor crecimiento por parte de la cepa 3003. Ingredientes activos como prochloraz –1 y –2 mantuvieron un nivel de sensibilidad bastante alto inhibiendo el crecimiento tanto de *B. cinerea* como de la cepa 3003 (tabla 7).

En cuanto a la relación de la cepa 3004 con *B. cinerea* (cepa 3015) se vieron mayores crecimientos por parte de este endófito con respecto a ingredientes activos como boscalid, captan, pyrimethanil, carboxin más thiram y fludioxonil más ciprodinil, no obstante *B. cinerea* creció más en las dos concentraciones de iprodione y en los controles evaluados. Se repite la misma característica anterior para prochloraz –1 y –2 (tabla 8).

Tabla 6. Relación entre el crecimiento de *B. cinerea* (cepa 3015) y la cepa 3002 mediante la diferencia en centímetros y en porcentaje durante el día 16 en medios enmendados y sin enmendar

i.a	Cepa 3015 frente a Cepa 3002		
	Control (%)	AME+C1 (%)	AME+C2 (%)
Boscalid 50%	(B) –0,13	(H) 41,25	(H) 49,5
Captan 50%	(B) –0,13	(H) 40,50	(B) -36,88
Iprodione 50%	(B) –0,13	(B) -12,75	(H) 18,63
Pyrimethanil 40%	(B) –0,13	(H) 77,63	(H) 24,5
Carboxin +Thiram 40%	(B) –0,13	(H) 38,38	(H) 32,13
Fludioxonil+Ciprodinil 62,5%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00
Prochloraz-1 45%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00
Prochloraz-2 45%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00

(B) *B. cinerea* (cepa 3015) tuvo mayores crecimientos; (H) cepa 3002 tuvo los mayores crecimientos; (NC) no hay crecimiento de *B. cinerea* (cepa 3015) ni de la cepa 3002.

Tabla 7. Relación entre el crecimiento de *B. cinerea* (cepa 3015) y la cepa 3003 mediante la diferencia en cm y en porcentaje durante el día 16 en medios enmendados y sin enmendar.

i.a	Cepa 3015 frente a Cepa 3002		
	Control (%)	AME+C1 (%)	AME+C2 (%)
Boscalid 50%	(B) –0,13	(H) 41,25	(H) 49,5
Captan 50%	(B) –0,13	(H) 40,50	(B) -36,88
Iprodione 50%	(B) –0,13	(B) -12,75	(H) 18,63
Pyrimethanil 40%	(B) –0,13	(H) 77,63	(H) 24,5
Carboxin +Thiram 40%	(B) –0,13	(H) 38,38	(H) 32,13
Fludioxonil+Ciprodinil 62,5%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00
Prochloraz-1 45%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00
Prochloraz-2 45%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00

(B) *B. cinerea* (cepa 3015) tuvo mayores crecimientos; (H) la cepa 3003 tuvo los mayores crecimientos; (NC) no hay crecimiento de *B. cinerea* ni de la capa 3003.

Tabla 8. Relación entre el crecimiento de *B. cinerea* (cepa 3015) y la cepa 3004 mediante la diferencia en cm y en porcentaje durante el día 16 en medios enmendados y sin enmendar

i.a	Cepa 3015 frente a cepa 3004		
	Control (%)	AME+C1 (%)	AME+C2 (%)
Boscalid 50%	(B) –2	(H) 41,25	(H) 49,5
Captan 50%	(B) –2	(H) 84,88	(S) 0,00
Iprodione 50%	(B) –2	(B) -48,13	(B) -18,88
Pyrimethanil 40%	(B) –2	(H) 31,25	(H) 36,75
Carboxin +Thiram 40%	(B) –2	(H) 89,75	(H) 11,38
Fludioxoni+Ciprodinil 62,5%	(B) –2	(H) 2,25	(H) 4,38
Prochloraz-1 45%	(B) –2	(NC) 0,00	(NC) 0,00
Prochloraz-2 45%	(B) –2	(NC) 0,00	(NC) 0,00

(B) *B. cinerea* (cepa 3015) tuvo mayores crecimientos; (H) la cepa 3004 tuvo los mayores crecimientos; (S) ambos obtuvieron diámetros de 8 cm; (NC) no hay crecimiento de *B. cinerea* ni de la cepa 3004.

En la relación comparativa entre la cepa 3005 y *B. cinerea* (cepa 3015), este último obtuvo los mejores crecimientos en iprodione en las dos concentraciones estudiadas y en la concentración dos de captan (tabla 9). Por otro lado, la cepa 3005 tuvo mejores crecimientos en boscalid, en la concentración uno de captan, pyrimethanil, en la concentración uno de carboxin más thiram, y en fludioxonil más ciprodinil (tabla 9). Se concluye para los controles y para prochloraz –1 y –2 que se observaron los mismos parámetros en las relaciones anteriormente estudiadas (tabla 9).

Finalmente, en la relación de crecimiento entre *B. cinerea* (cepa 3015) y la cepa 3006, *B. cinerea* obtuvo los mejores crecimientos de las concen-

Tabla 9. Relación entre el crecimiento de *B. cinerea* (cepa 3015) y la cepa 3005 mediante la diferencia en cm y en porcentaje durante el día 16 en medios enmendados y sin enmendar

i.a	Cepa 3015 frente a Cepa 3002		
	Control (%)	AME+C1 (%)	AME+C2 (%)
Boscalid 50%	(B) –0,13	(H) 41,25	(H) 49,5
Captan 50%	(B) –0,13	(H) 40,50	(B) -36,88
Iprodione 50%	(B) –0,13	(B) -12,75	(H) 18,63
Pyrimethanil 40%	(B) –0,13	(H) 77,63	(H) 24,5
Carboxin +Thiram 40%	(B) –0,13	(H) 38,38	(H) 32,13
Fludioxonil+Ciprodinil 62,5%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00
Prochloraz-1 45%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00
Prochloraz-2 45%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00

(B) *B. cinerea* (cepa 3015) tuvo mayores crecimientos; (H) la cepa 3005 tuvo los mayores crecimientos; (NC) no hay crecimiento de *B. cinerea* ni de la cepa 3005.

traciones uno y dos de boscalid e iprodione, en la concentración uno de pyrimethanil, y en la concentración dos de captan (tabla 10). En el caso de la cepa 3006 se observaron crecimientos mayores en ingredientes activos como carboxim más thiram, captan en la concentración uno fludioxonil más ciprodinil y prochloraz –1 en ambas concentraciones (tabla 10). Los controles tuvieron el mismo comportamiento observado para las otras relaciones, y el único ingrediente activo que mantuvo su alta sensibilidad tanto en *B. cinerea* como en la cepa 3006 fue prochloraz –2 (tabla 10).

DISCUSIÓN

Pocos son los estudios que, a nivel del trópico, se han realizado sobre susceptibilidad de hongos endófitos de angiospermas leñosas a fungicidas usados en cultivos económicamente importantes. Por esta razón, la presente investigación, enfocada a

Tabla 10. Relación entre el crecimiento de *B. cinerea* (cepa 3015) y la cepa 3006 mediante la diferencia en cm y en porcentaje durante el día 16 en medios enmendados y sin enmendar

i.a	Cepa 3015 frente a Cepa 3002		
	Control (%)	AME+C1 (%)	AME+C2 (%)
Boscalid 50%	(B) –0,13	(H) 41,25	(H) 49,5
Captan 50%	(B) –0,13	(H) 40,50	(B) -36,88
Iprodione 50%	(B) –0,13	(B) -12,75	(H) 18,63
Pyrimethanil 40%	(B) –0,13	(H) 77,63	(H) 24,5
Carboxin +Thiram 40%	(B) –0,13	(H) 38,38	(H) 32,13
Fludioxonil+Ciprodinil 62,5%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00
Prochloraz-1 45%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00
Prochloraz-2 45%	(B) –0,13	(NC) 0,00	(NC) 0,00

(B) *B. cinerea* (cepa 3015) tuvo mayores crecimientos; (H) la cepa 3006 tuvo los mayores crecimiento; (NC) no hay crecimiento de *B. cinerea* ni de la cepa 3006.

analizar la susceptibilidad in vitro de hongos endófitos –promisorios para el control de patógenos– a fungicidas de amplio espectro de acción, demuestra ser uno de los estudios pioneros. Se estudió la susceptibilidad de hongos endófitos de especies leñosas como la *rosa* sp, a diferentes ingredientes activos de fungicidas frecuentemente empleados en estos cultivos (boscalid, captan, iprodione, pyrimethanil, carboxin más thiram, fludioxonil más ciprodinil, prochloraz –1 y –2). Estudios de Ker-Chung (2001) han reportado altas susceptibilidades a fungicidas con ingredientes activos como prochloraz por parte de hongos endófitos de carácter patógeno como *Colletotrichum gloeosporioides* en mango, determinándose una no resistencia a este fungicida en plantaciones por más de trece años.

Según los parámetros de susceptibilidad establecidos para este estudio, se obtuvieron diferentes niveles de sensibilidad (altos a bajamente sensibles) en algunos de los hongos endófitos evaluados en ingredientes activos (en las dos concentraciones) como carboxin más thiram y fludioxonil más ciprodinil. Evaluaciones realizadas en campo con *Botrytis cinerea* por Santomauro et ál. (2000) demostraron no resistencias con ingredientes activos como las anilinopyrimidinas. Sin embargo, evaluaciones *in vitro* realizadas por el comité de acción de resistencia a fungicidas (FRAC) han demostrado que se pueden presentar riesgos de resistencias medias en algunas cepas, principalmente de hongos como *Botrytis cinerea* y *Venturia inaequalis* (FRAC, 2005). En el caso de fenilpirroles (fludioxonil), se ha observado que el grado de resistencia a estos fungicidas en campo es bajo y con rendimientos iguales y, algunas veces, superiores a otros fungicidas como ronilan, demostrándose como una alternativa promisoria en el control de moho blanco y gris en vainas de fríjol seco en Nueva York (Shah et ál., 2002). Así mismo, se han observado frecuencias de resistencia bajas al evaluar ingredientes activos pertenecientes a los fenilpirroles (fludioxonil) y aninlino primidinas (ciprodinil) en el control del moho gris en viñedos de Francia (Leroux et ál., 2000; Lupton et ál., 2005) Respecto a carboximidas (carboxin) se han reportado resistencias de riesgo medio conocidas para hongos específicos. En los ditiocarbamatos, según el comité de resistencia a fungicidas, no se ha documentado ningún signo de resistencia, siendo éstos de bajo riesgo (FRAC, 2005).

Los mayores crecimientos in vitro por parte de los hongos endófitos fueron en ingredientes activos como boscalid, captan, iprodione y pyrimethanil. Éstos han sido reportados como ingredientes activos de fungicidas con resistencias desde riesgo medio y bajo riesgo, hasta resistencias muy comunes como en el caso de *Botrytis cinerea* y otros hongos (FRAC, 2005). Además, en diferentes estudios se han reportado diversos grados de resistencia a nivel de laboratorio, principalmente en patógenos (FRAC, 2005; Köller et ál., 2005; Shah et ál., 2002; Santomauro et ál., 2000; Petsikos-Panayotarou et ál., 2003). Los diversos grados de resistencia a los ingredientes activos evaluados en los hongos endófitos y de *B. cinerea* de este estudio, se pudieron generar posiblemente por una presión de selección de éstos en los diferentes medios, permitiendo su supervivencia y habilidad de crecimiento, generándose así cepas con diferentes grados de sensibilidad a los fungicidas evaluados. Se cree que esta presión de selección es creada por mutaciones genéticas, que pueden ser dirigidas por la mutación de un solo gen (resistencia cualitativa) o diferentes grupos de genes (resistencia cuantitativa o poligénica), que podrían en muchos casos crear altos grados de resistencia de cepas determinadas a ingredientes activos de un mismo grupo (resistencia cruzada) o a ingredientes activos de diferentes grupos (resistencia múltiple) (Damicone, 2006; Gallian et ál., 2006).

Las diferencias de crecimiento de algunos de los hongos endófitos en las dos concentraciones de fungicidas evaluados para el día 16 podrían reflejar un fenómeno hormético (fenómeno de hórmesis: efecto en bajas concentraciones de un material tóxico estimulando al organismo blanco) (Luckey, 1993; Garzón y Moorman, 1999; Calabrese y Baldwin, 2000), ya que en algunos de los hongos endófitos las concentraciones mayores mostraron mejores diámetros de crecimiento en los diferentes ingredientes activos. En investigaciones realizadas por Garzón y Moorman (1999) se demostró que bajas concentraciones de fungicidas como propamocarb pudieron estimular el crecimiento de ciertos hongos como *Pythium* en plantaciones de geranios, en las cuales se desarrolló más del 38% de la enfermedad en comparación con las plantaciones no tratadas.

Las susceptibilidades de crecimientos in vitro de *Botrytis cinerea* (cepa 3015) en medios enmen-

dados con fungicidas como pyrimethanil, carboxin más thiram, fludioxonil más ciprodinil, prochloraz –1 y –2 arrojaron en las dos concentraciones grados de alta sensibilidad, demostrando la gran eficacia de estos ingredientes activos contra *B. cinerea.* Esto ha sido ampliamente demostrado en varias investigaciones realizadas tanto en campo como en laboratorio (Lupton et ál., 2005; Köhl et ál., 1998; Shah et ál., 2002; Sergeeva et ál., 2001; Saladin et ál., 2003; FRAC, 2005). Los crecimientos de *Botrytis cinerea* (cepa 3015) en fungicidas con ingredientes activos como boscalid, captan e iprodione demuestran el bajo grado de sensibilidad en las dos concentraciones evaluadas, lo cual ha sido ampliamente corroborado en otras cepas de *Botrytis cinerea* (Myers, 2006; Köhl et ál., 1998; Santomauro et ál., 2000; Beresford, 1994; FRAC, 2005).

A pesar de las diferencias en el tiempo de óptimo crecimiento de *B. cinerea* (cepa 3015) con respecto a los hongos endófitos evaluados en los medios sin enmendar, se observó claramente que en general estos últimos pueden tener mayores crecimientos que *B. cinerea* en medios enmendados en las dos concentraciones, lo cual genera mayores expectativas respecto a sus posibles usos (colonización de hongos endófitos en rosas de corte y compatibilidad con los fungicidas de aplicación para controlar la enfermedad, integrando los dos tipos de manejo) en invernadero o campo. Estudios de sensibilidad a fungicidas desarrollados con controladores biológicos epifitos como *Trichoderma* spp y *Clonostachys rosea* demostraron una baja sensibilidad a ingredientes activos como carboxin más thiram; no obstante, se confirmaron toxicidades in vitro de fungicidas como prochloraz, guazatine y triticonazole hacia éstos. Sin embargo, en mezclas de fungicidas como carboxin más thiram y triticonazole con los hongos de interés en control biológico, tanto en cámaras de crecimiento como en campo, dieron resultados satisfactorios para el control de *Fusarium culmorun* en trigo, demostrando un eficiente control al implementar un manejo integrado (Roberti et ál., 2006). Esto mismo se debería implementar en estudios futuros para el control de *Botrytis cinerea* en rosa teniendo en cuenta la naturaleza endofítica de los hongos aislados de *R. hybrida.*

Una de las principales razones por las cuales las evaluaciones de sensibilidad a fungicidas a nivel in vitro algunas veces no corroboran los resultados obtenidos en campo, es que la naturaleza química de los componentes utilizados en los medios que van a ser enmendados pueden generar una baja en las potencias inhibitorias por parte de ingredientes activos como las anilinopirimidinas. Por ejemplo, medios de composición compleja con ingredientes con extracto de malta o levadura pueden causar este efecto (Köller et ál., 2005). Esto podría ser lo ocurrido en esta investigación para el caso de las anilinopirimidinas (ciprodinil y pyrimethanil), ya que se escogió un medio complejo para el ensayo, por poseer características especiales que permiten el crecimiento óptimo de los endófitos.

En general, los mayores crecimientos con bajas sensibilidades en las concentraciones de algunos de los ingredientes activos evaluados podrían deberse a mecanismos de transporte de compuestos químicos a través de la membrana plasmática. Éstos proveen en los organismos que las poseen protección contra productos tóxicos (De Waard et ál., 2006). Las investigaciones están enfocadas en patógenos de plantas con base en la función de estos transportadores sobre la sensibilidad y la resistencia a fungicidas por parte de cepas que nunca han tenido contacto con estos productos tóxicos (De Waard et ál., 2006). Estos mecanismos de detoxificación están siendo estudiados actualmente, y se han encontrado para diversos hongos de carácter patógeno tanto de plantas como de animales y humanos (De Waard et ál., 2006; Nakaune et ál., 1998; Nakaune et ál., 2002; Cascorbi, 2006; Wanders y Waterhand, 2006). Transportadores como el mecanismo casete ABC de unión a ATP están siendo investigados para diversos patógenos (*Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella*, *Aspergillus* y *Penicillium*) que podrían mediar la resistencia multidrogas a fungicidas. Estos transportadores podrían ser específicos para ciertos fungicidas como es el caso de la resistencia a azoles, a hidrocarburos aromáticos, fenilpirroles, entre otros (Hayashi et ál., 2002; Schoonbeek et ál., 2001; Stergiopoulos et ál., 2003; De Waard et ál., 2006). Teniendo en cuenta que éste es sólo un estudio preliminar, y no abarca todos los procesos investigativos para llegar a las posibles explicaciones a estas susceptibilidades, este trabajo permite visualizar la necesidad de realizar investigaciones más profundas al respecto que nos permitan poder llegar a un mayor grado de conocimiento

Muchos hongos viven de manera obligada dentro de las plantas y no se han explotado biotecnológicamente de manera positiva a nivel agrícola y ambiental en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades. Así mismo, es importante la identificación taxonómica tanto de manera clásica como molecular (Arnold et ál., 2005) ya que en esta investigación los hongos evaluados fueron anteriormente descritos (Salgado, 2005) en la forma clásica observándose en la mayoría morfotipos con morfologías de micelio estéril, por lo que no se pudieron agrupar en un filo verdadero.

CONCLUSIONES

Los grados de susceptibilidad de crecimiento de los hongos endófitos evaluados fueron variables, teniendo en cuenta los ingredientes activos probados en las diferentes concentraciones evaluadas. Sin embargo, el 45,45% de los hongos analizados demostró crecimientos desde ≥3,9 cm hasta diámetros ≥ 5,9 cm, lo cual muestra la capacidad de crecimiento en esos ingredientes activos con diferentes modos de acción, dejando la posibilidad de ahondar más acerca de los mecanismos moleculares por los cuales estos hongos son capaces de obtener crecimiento en condiciones adversas.

En la relación de comparación de crecimiento, los hongos endófitos, a pesar de tener crecimientos un poco más bajos con relación a *B. cinerea* (cepa 3015) en el control (día 16), demostraron alcanzar mayores diámetros en los dos tratamientos, y podrían generar un gran interés como organismos de utilidad en el control biológico de patógenos incluyendo a *B. cinerea.* Se espera en próximos estudios poder realizar pruebas de colonización de estos hongos o evaluación de sus extractos in vivo, para corroborar los estudios in vitro realizados por Salgado (2005) y los presentados en esta investigación, y corroborar la acción in vivo de estos endófitos o sus metabolitos en el control biológico y manejo integrado de *B. cinerea* y otros patógenos de interés agrícola.

Las evaluaciones en invernadero, en estudios de colonización y reintroducción de endófitos, son importantes para ver su acción in vivo y su comportamiento frente a fungicidas y plaguicidas en general. Las pruebas in vitro nos dan una buena visión para determinar en qué momento se deberían inocular los endófitos y la frecuencias de aplicaciones que se debe tener para éstos con el fin de mantener una población estable dentro del tejido de la planta y pueda desempeñar de mejor manera las relaciones simbióticas con su hospedador.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo financiero del Fondo de Investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes. Al estadístico Orlando Martínez por su valiosísima colaboración en los análisis de datos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arnold, A.; Maynard, Z.; Gilbert, G.; Coley, P.; Kursar, T. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters.* 3 (4): 267-274.

Arnold, A. E. 1999. Fungal endophytes of tropical trees: methods and potential for biological control of fungal pathogens of cocoa. *Proceedings of the Research Methodology of Biocontrol of Plant Diseases Workshop*, San Jose: CATIE.

Arnold, E.; Mejía, C.; Kyllo, D.; Rojas, I.; Maynard, Z.; Robbins, N.; Herre, E. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 100 (26): 15649-15654.

Arnold, E.; Miadlikowska, J.; Higgins, K.; Dalling, J.; Gallery, R.; Henk, D.; Eells, R.; Vilgalys, R.; Lutzoni, F. 2005. What can enviromental PCR tell us about foliar fungal endophyte communites. *Inoculum*. 56(4): 6.

Azevedo, J.; Maccheroni, W.; Pereira, J.; De Araujo, W. 2000. Endophytic microorganisms: a review and insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(1): 40-65.

Bacon, W.**;** Yates, I.; Hinton, D.; Meredith, F. 2001. The Potential Impacts of Climate Variability and Change on Air Pollution-Related Health Effects in the United States. *Environmental Health Perspectives Supplements*. 109(S2).

Beresford, R. 1994. Understanding fungicide resistance. Fungicide Resistance Symposium at Reading University in England. *The Orchardist.* 67(9): 24.

Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A. 2000.Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Human and Experimental Toxicology*. 19: 2-31.

Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology.* 69(1): 2-9.

Clay, K.; Schardl, C. 2002. Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. *The American Naturalist*. 160: 99-127.

Corrado, M.; Rodrigues, K. F. 2004. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis sp*. *Journal of Basic Microbiology*. 44(2): 157-60.

Cascorbi, I. 2006. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacology & Therapeutics.* 112(2): 457-473.

Damicone, J. 2006. Fungicide Resistance Management. Oklahoma Cooperative Extension Management. http://www.osuextra.com. [Consultado en: febrero 24 de 2007]: 7663-7668.

De Waard, M.; Andrade, A.; Hayashi, K.; Schoonbeek H.; Stergiopoulos, I.; Zwiers L. 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug, resistanse and virulence. *Pest Management Science*. 62(3): 195-207.

Dhingra, O. D. 1987. *Basic plant pathology methods*. Boca Ratón: CRP Press Inc.

FRAC, 2005. Pathogen risk list. www.frac.info/frac/index .htm. [Consultado: junio 16 de 2006].

Garcés de Granada, E.; Orozco de Amézquita, M. 2003. Algunos problemas patológicos y fisiológicos de la floricultura en Colombia. Bogotá: Unibiblos.

Garzón, D.; *Moorman, G. 1999. Pythium* Root Rots in Greenhouse Crops. Pennsylvania floral industry association online. www.pafloral.org/research/pythium_ root_rots.htm. [Consultado: junio 22 de 2006].

Gallian, J.; Miller, J.; Nolte, P. 2006. Managing Fungicide Resistance. University of Idaho Extensión. Idaho Agricultural Experiment Station. www.uidaho.edu/ sugarbeet/Managingfungresist.htm. [Consultado: febrero 24 de 2007]: 1-8.

Haugaard, H. 2002. New method combats plant disease. Institute for Plant Biology. http://glwww.mst.dk/ project/NyViden/2000/080 50000.htm. [Consultado: enero 8 de 2006].

Hawksworth, D. L. 1993. The tropical fungal biota: census, pertinence, prophylaxis, and prognosis. In: Isaac, S.; Frankland, J. C.; Watling, R.; Whalley, A. J. S. (editors). *Aspects of tropical mycology*. Cambridge UK: Cambridge University Press. p. 265-293.

Hawksworth, D. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research.* 105(12): 1422-1432.

Hayashi, K.; Schoonbeek, H.; De Waard, M. 2002. Bcmfs1, a novel major facilitator superfamily transporter from *Botrytis cinerea*, provides tolerance towards the natural toxic compounds camptothecin and cercosporin and towards fungicides. *Applied Environmental Microbiology.* 68(10): 4996-5004.

Holmes, H. J.; Schroers, T.; Evans, H.; Samuels, G. J. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress*. 3(2): 199-210.

Istifadah, L.; Saleeba, J. A.; McGee, P. A. 2006. Isolates of endophytic *Chaetomium* spp inhibited the fungal pathogen Pyrenophora tritici-repentis *in vitro*. *Canadian Journal Botanics*. 84: 1148-1155.

Ker-Chung, Kuo. 2001. Sensitivity of Mango Anthracnose Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*, to the Fungicide Prochloraz *Taiwan.* Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life Sciences (Taipei). 25(3): 174-179.

Köhl, J.; Gerlagh, M.; De Haas, B.; Krijger, M. 1998. Biological Control of *Botrytis cinerea* in Cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* Under Commercial Growing Conditions. *Phytophatology.* 88: 568-575.

Köller, W.; Wilcox, W.; Parker, D. 2005. Sensitivity of *Venturia inaequalis* Populations to Anilinopyrimidine Fungicides. *Plant Disease.* 89: 357-365.

Leroux, P.; Rinville, C.; Moncomble, D. 2000. Resistance risk management for the control of grey mould in the champagne vineyards. Posters of the XIIth International *Botrytis* symposium. France.

Lodge, D.; Fisher, P.; Sutton, B. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia.* 88(5): 733-738.

Luckey, T. 1993. *Radiation Hormesis*. Boca Raton: CRC Press, Publisher, 1991. Japanese, Soft Science, Inc., Tokyo. http://www.giriweb.com/luckey.htm [Consultado: julio 10 de 2006].

Lupton, T.; Geelen, A.; Wood, P. 2005. Comparison of fungicide options for control of *Botrytis*. Hawke´s Bay Focus Vineyard Seminar www.nzwine.com/assets//yd_HBFV_Seminar_Handout_12_10_05.pd. [Consultado: Junio 12 de 2006].

Myers, A. 2006. *Botrytis* Bunch Rot and Blight. Virginia Polytechnic Institute and State University. Online

Guide to Grapevine Diseases Virginia Tech. 4 p. arecs.vaes.vt.edu/webinfo/files/B3.pdf. [Consultado: julio 15 de 2006].

Nakaune, R.; Adachi, K.; Nawata, O.; Tomiyama, M.; Akutsu, K.; Hibi, T. 1998. A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium* digitatum. *Applied and Environmental Microbiology.* 64(10): 3983-3988.

Nakaune, R.; Hamamoto, H.; Imada, J.; Akutsu, K.; Hibi, T. 2002. A novel ABC transporter gene, PMR5, is involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Molecular Genetics and Genomics.* 267(2): 179-185.

Olson, B. D. 2001. Crop Diseases and Yield Losses. In: Peterson, R. K.; Higley, L. G. (editors). *Biotic stress and Yield Loss*. Boca Ratón: CRC Press.

Petsikos-Panayotarou, N.; Markellou, E.; Kalamarakis, A.; Kyriakopoulou, D.; Malathrakis, N. 2003. In vitro and in vivo activity of cyprodinil and pyrimethanil on botrytis cinerea isolates resistant to other botryticides and selection for resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. *European journal of plant pathology.* 109(2): 173-182.

Roberti, R.; Badiali, F.; Pisi, A.; Veronesi, A.; Pancaldi, D.; Cesari, A. 2006. Sensitivity of *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* spp.as Potential Biocontrol Agents to Pesticides. *Journal of Phytopathology.* 154 (2): 100-109.

Rubini, M.; Silva-Ribeiro, R.; Pomilla, A.; Maki, C.; Araújo, W.; Azevedo, J. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao L*) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences.* 1: 24-33.

Saladin, G.; Magné, C.; Clément, C. 2003. Effects of fludioxonil and pyrimethanil, two fungicides used against *Botrytis cinerea*, on carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Pest Management Science.* 59(10): 1083-1092.

Salgado, C. 2005. Hongos endófitos en *Rosa híbrida*: aislamiento, identificación y evaluación in vitro de la capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos. Tesis. Universidad de los Andes.

Salgado, C.; Cepero de García, M. 2005. Aislamiento de hongos endófitos de rosa (*R. hybrida*) en Bogotá, Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*. 22: 99-101.

Santomauro, A.; Pollastro, S.; De Guido, M.; De Miccolis Angelini, R.; Natale, P.; Faretra, F. 2000. A long-term trial on the effectiveness of new fungicides against grey mould on grapevine and on their influence on the pathogen's population. Posters of the XIIth International Botrytis symposium. France. www.u-bourgogne.fr/IUVV/P75.pdf. [Consultado: mayo 15 de 2006].

Schoonbeek, H.; Del Sorbo, G.; De Waard, M. 2001. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Molecular Plant Microbe Interaction.* 14(4): 562-571.

Schulz, B.; Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. Review. *Mycological Research.* 109(6): 661-686.

Sergeeva, V.; Nair, N.; Verdanega, J.; Shen, C.; Barchia, L.; Spooner-Hart, R. 2001. First report of anilinopyrimidine-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* on grapevines in Australia. *Australasian Plant Pathology.* 31(3): 299-300.

Shah, D.; Dillard, H.; Cobb, A. 2002. Alternatives to vinclozolin (ronilan) for controlling gray and white mold on snap bean pods in New York. *Plant Health Progress.*

Stergiopoulos I.; Van Nistelrooy, J. G.; Kema, G. H.; De Waard, M. A. 2003. Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science.* 59(12): 1333-43.

Strobel, G. A. 2003. Endophytes as source of bioactive products. *Microbes & Infection*. 5: 535-544.

Wanders, R. J.; Waterham, H. R. 2006. Biochemistry of Mammalian peroxisomes. Annual Review of Biochemestry. 75: 295-332.

Wayne, W. D. 2002 Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. México: Limusa-Wiley, pp. 295-359.