

Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates obtained from strawberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin fungicides

Sensibilidad de aislados de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa a los fungicidas metil tiofanato y azoxystrobin

David Espinoza-Altamirano, Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México. CP 56235 Tel. 5959521500; Hilda Victoria Silva-Rojas, Producción de Semillas, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México. CP 56230 Tel. 5959520265; Santos Gerardo Leyva-Mir, Nahum Marbán-Mendoza, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México. CP 56235 Tel. 5959521608; Ángel Rebollar-Alviter*. Centro Regional Morelia, y Posgrado en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo. Periférico Paseo de la República No. 1000, Morelia, Michoacán, México. CP 58170 Tel. 4433161489. *Autor para correspondencia: rebollaralviter@gmail.com.

Recibido: 11 de diciembre, 2016.

Aceptado: 17 de enero, 2017.

Espinoza-Altamirano D, Silva-Rojas HV, Leyva-Mir SG, Marbán-Mendoza N, Rebollar-Alviter A. 2017. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates obtained from strawberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin fungicides. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 186-203.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1612-4

Primera publicación DOI: 5 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 5, 2017.

Resumen. El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad de *Colletotrichum acutatum* a los fungicidas metil tiofanato y azoxystrobin, basada en el crecimiento de micelio y germinación de conidios. Se evaluaron 60 aislados monoconidiales de dos regiones productoras de fresa del estado de Michoacán, en medio de cultivo enmendado con

Abstract. The objective of this study was to determine the sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to the fungicides thiophanate-methyl and azoxystrobin, based on mycelial growth and conidia germination. Sixty monoconidial isolates from two strawberry-producing regions of Michoacan state were evaluated in culture medium amended with fungicides at 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10, 100 and 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The effective dose that reduced mycelial growth by 50 % (ED_{50}) of thiophanate-methyl varied from 0.28 to 9.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the Maravatío Valley and from 1.39 to 2.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the Zamora Valley. In conidia, the ED_{50} ranged from 0.9 to 396.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the Maravatío Valley and from 0.43 to 63.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the Zamora Valley. For azoxystrobin the ED_{50} in mycelium ranged from 0.04 to 0.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Maravatío and from 0.07 to 0.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Zamora. In the

0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10, 100 y 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fungicidas. La dosis efectiva que redujo en un 50% el crecimiento micelial (DE_{50}) del metil tiofanato varió de 0.28 a 9.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el valle de Maravatío y de 1.39 a 2.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el valle de Zamora. En conidios la DE_{50} varió entre 0.9 a 396.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el valle de Maravatío y de 0.43 a 63.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el valle de Zamora. Para el azoxystrobin las DE_{50} en micelio variaron de 0.04 a 0.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en Maravatío y de 0.07 a 0.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en Zamora. En conidios las DE_{50} variaron de 0.01 a 0.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Maravatío y 0.006 a 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en Zamora. Las distribuciones de las DE_{50} indicaron que los aislados de *C. acutatum* fueron sensibles al azoxystrobin y moderadamente resistentes al metil tiofanato.

Palabras clave: Benzimidazoles, QoI, Resistencia a fungicidas

En México, la superficie cultivada de fresa (*Fragaria × ananassa*) supera las 10,000 ha. De esta superficie, cerca del 60 % se encuentra en el estado de Michoacán (SIAP, 2016). Entre los factores fitopatológicos que más impactan en la producción de fresa, se encuentra la antracnosis del fruto, la cual se ha asociado principalmente a la especie *Colletotrichum acutatum* (Turecheck *et al.*, 2006) especialmente en los sistemas de producción en campo abierto y de nivel tecnológico medio a bajo y en las áreas del cultivo expuesta a la lluvia en los sistemas protegidos, en la cual se favorece la dispersión de conidios por salpique a partir de fuentes de infección primaria y de planta a planta (Smith, 2008).

El manejo de la enfermedad, se basa principalmente en el establecimiento de plantas libres del patógeno (Smith, 2008; Freeman, 2008), la eliminación de plantas y frutos con síntomas, residuos

conidia the ED_{50} varied from 0.01 to 0.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for Maravatío and 0.006 to 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Zamora. The ED_{50} distributions indicated that *C. acutatum* isolates were sensitive to azoxystrobin and moderately resistant to methyl thiophanate.

Key words: Benzimidazole, QoI, fungicide resistance

In Mexico, the area planted to strawberry (*Fragaria × ananassa*) accounts for more than 10,000 hectares, nearly 60 % of which is located in the state of Michoacán (SIAP, 2016). Among the phytopathological factors that mostly affect strawberry production is anthracnose. This disease has been associated mainly with the species *Colletotrichum acutatum* (Turecheck *et al.*, 2006), especially in farm systems where the crop is grown in open fields with a low to medium level of technology, or in protected systems where the crop is exposed to rain. This condition favors the spread of conidia by splashing from primary infection sources and from plant to plant (Smith, 2008).

The disease management is based mainly on establishing pathogen-free plants (Smith, 2008; Freeman, 2008), elimination of symptomatic plants and fruits and removing crop residues and alternate hosts (Freeman, 2008; Parikka and Lemmetty, 2009). Resistant varieties and biological control have also been used (Wharton and Diéguez-Uribeondo, 2004; Hammerschlag *et al.*, 2006). Although preventive fungicides, such as Captan, Thiram, and different copper-based formulations, are the most frequently used, and other fungicides with specific mode of action, such as cyprodinil+fludioxonil, pyraclostrobin, azoxystrobin and thiophanate methyl, are often used as well (Turechek *et al.*, 2006; Wedge *et al.*, 2007). The specific mode of action of these fungicides and

de plantas y remoción de hospedantes alternos (Freeman, 2008; Parikka y Lemmetty, 2009), variedades resistentes y control biológico (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004; Hammerschlag *et al.*, 2006). Aunque entre los fungicidas usados con frecuencia se encuentran los de efecto preventivo como captan, thiram y diferentes formulaciones a base de cobre, aquellos de modo de acción específica se aplican con frecuencia para el manejo de esta enfermedad, entre ellos el ciprodinil+fludioxonil, pyraclostrobin, azoxystrobin y metil tiofanato (Turcek *et al.*, 2006; Wedge *et al.*, 2007). El modo de acción específica y el uso frecuente de estos fungicida implican riesgo para el desarrollo de resistencia en los hongos por lo que deben ser utilizados bajo ciertos principios para un manejo efectivo de la resistencia como son la dosis correcta, número de aplicaciones, mezclas del modo de acción, alternaciones y los tiempos o momentos de aplicación (van den Bosh *et al.*, 2014). Al respecto, es esencial el monitoreo frecuente de la sensibilidad de las poblaciones de hongos y oomycetes en diferentes zonas a nivel regional o nacional a fin de determinar posibles cambios en la distribución de la sensibilidad originados por diferentes mecanismos y en su caso, tomar las medidas correspondientes para retardar, posponer o evitar el desarrollo de resistencia que resulte en pérdidas significativas en los cultivos por la reducción en la vida efectiva del fungicida (van den Bosh *et al.*, 2014; Corio-Costet, 2015), enfoque que debe formar parte de una estrategia de manejo integrado de enfermedades (Hollomon, 2015).

Al ser *C. acutatum* uno de los agentes causales de antracnosis en varios cultivos y en especial en cítricos y fresa, conocer la sensibilidad a los fungicidas de mayor uso, permiten una mejor toma de decisiones en el diseño de estrategias de manejo integrado de la enfermedad. En cítricos Mondal *et al.* (2005) reportaron líneas base (previo al uso de

their frequent use pose a risk because they cause the pathogen to develop resistance. Therefore, they must be utilized following certain guidelines for effectively managing resistance (the correct dose, number of applications, mixing fungicides that have a different mode of action, alternation and application timing) (van den Bosh *et al.*, 2014). It is also essential to frequently monitor the sensitivity of fungal and oomycete populations in different areas at the regional or national level so as to detect changes in the distribution of sensitivity caused by different mechanisms. If necessary, implement appropriate measures to delay, postpone or prevent the development of resistance, which could cause significant crop losses due to the reduction of the fungicides' effective life (van den Bosh *et al.*, 2014; Corio-Costet, 2015). This approach must be included in all integrated disease management strategies (Hollomon, 2015).

Given that *C. acutatum* is one of the causal agents of anthracnose in several crops, and especially in citrus and strawberry, knowing their sensitivity to the most frequently used fungicides would allow us to make better decisions when formulating integrated disease management strategies. In the case of citrus, Mondal *et al.* (2005) reported base lines (before fungicide use) with DE_{50} between 0.09-0.77 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and 0.01 a 0.034 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for azoxystrobin and pyraclostrobin, respectively. On the other hand, Forcelini *et al.* (2016) evaluated the resistance of *C. acutatum* isolates to strobilurin fungicides or QoI (quinone outside inhibitors) on strawberry crops in Florida, based on mycelial growth and germ tube length. DE_{50} values for azoxystrobin were 0.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in isolates collected from 1994 to 2011; for pyraclostrobin, the average DE_{50} was 0.012 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Isolates obtained later from sites that had a history of use of these fungicides showed no sensitivity with values higher than 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for pyraclostrobin

los fungicidas) con DE_{50} entre 0.09 a 0.77 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0.01 a 0.034 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para azoxystrobin y pyraclostrobin respectivamente. Por otro lado, Forcelini *et al.* (2016) evaluó la resistencia de aislados de *C. acutatum* a fungicidas estrobilurinas o QoI (Inhibidores Externos de la Quinona) en el cultivo de fresa en Florida con base en crecimiento micelial y la longitud del tubo germinativo. Los valores de las DE_{50} para azoxystrobin resultaron en 0.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en aislados colectados de 1994 al 2011, mientras que para el pyraclostrobin la DE_{50} media resultó en 0.012 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Aislados obtenidos posteriormente con historial de uso de estos fungicidas mostraron insensibilidad con valores superiores a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para pyraclostrobin y azoxystrobin respectivamente. La secuenciación de gen del citocromo *b* confirmó que los aislados resistentes tuvieron las mutaciones G143A y F129L.

El grupo de fungicidas benzimidazoles, entre ellos en benomil, tiabendazol, carbendazim y metil tiofanato, son ampliamente usados en el cultivo de fresa en México desde hace más de 3 décadas. Asimismo, el grupo de las estrobilurinas, está en el mercado desde mediados de los años 90 y se encuentran registrados para su uso en este cultivo en México, por lo que el uso frecuente de estos ingredientes activos, podría resultar en falta de eficacia en campo. El objetivo de esta investigación fue determinar la sensibilidad de aislados de *C. acutatum*, obtenidos de fresa de los Valles de Maravatío y de Zamora en el estado de Michoacán, al metil tiofanato y al azoxystrobin con base en el crecimiento de micelio y germinación de conidios. Conocer el estado de la sensibilidad de *C. acutatum*, causante de la antracnosis de la fresa en dos de las principales zonas productoras de fresa en México permitirá ajustar los programas de manejo de la resistencia para posponer, retardar o evitar el desarrollo de este fenómeno y contribuir a un manejo más eficiente de la enfermedad.

and azoxystrobin, respectively. Sequencing of the cytochrome *b* gene confirmed that the resistant isolates had the G143A and F129L mutations.

Benzimidazole fungicides (benomyl, thiabendazole, carbendazim and thiophanate methyl, among others) have been widely used on strawberry crops in Mexico for over three decades. Furthermore, QoI (strobilurin) fungicides have been on the market since the mid-90s; in Mexico, their use on strawberry has been approved. However, the frequent use of these active ingredients may result in the lack of effectiveness in the field. The objective of this study was to determine the sensitivity of *C. acutatum* isolates obtained from strawberries collected in the Maravatío and Zamora valleys, state of Michoacán, to thiophanate methyl and azoxystrobin, based on mycelial growth and conidia germination. By knowing the sensitivity status of *C. acutatum*, which causes strawberry anthracnose in the two main strawberry producing areas of Mexico, we will be able to adjust resistance management programs to postpone, delay or prevent this phenomenon from developing and thus contribute to more effective disease management.

MATERIALS AND METHODS

Collecting and obtaining isolates

In 2009-2011, leaves, stolons and strawberries showing typical anthracnose symptoms were collected in commercial plots of Festival, Albión and Camino Real strawberry varieties in the Maravatío and Zamora valleys. To capture greater variability in the samples, they were taken from plots separated by a distance of 1 to 3 km, approximately.

The sensitivity test was conducted at the Phytopathology Laboratory of the Centro Regional

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y obtención de aislados

En la temporada 2009 al 2011 se colectaron hojas, estolones y frutos con síntomas típicos de antracnosis en parcelas comerciales de fresa de las variedades Festival, Albión y Camino Real en los Valles de Maravatío y Zamora. A fin de capturar una mayor variabilidad en las muestras, se consideraron parcelas con una separación entre 1 a 3 km aproximadamente.

El ensayo de sensibilidad se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Centro Regional Universitario Centro-Occidente (CRUCO) de la Universidad Autónoma Chapingo, en Morelia, Michoacán y la identificación molecular del patógeno se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad (PREGEP) del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

Obtención de aislados monoconidiales

De los frutos, hojas o estolones con síntomas, se seleccionaron porciones de tejido de aproximadamente 2 cm del área del área de avance del síntoma, se lavaron con agua, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % por 2 a 3 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente se secaron en una cámara de flujo laminar y se sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152, USA). A partir de los cultivos madre se obtuvieron cultivos monoconidiales mediante diluciones seriadas, los conidios se colocaron en agua-agar (AA) al 2 % y se incubaron por 10 a 18 h a temperatura del laboratorio. Posteriormente con una aguja de disección se extrajeron conidios individuales germinados y

Universitario Centro-Occidente (CRUCO), Universidad Autónoma de Chapingo, in Morelia, Michoacán, and the pathogen's molecular identification was performed at the Laboratory of Biotechnology and Seed Pathology for Postgraduate Students in Genetic Resources and Productivity (PREGEP), Colegio de Postgraduados, in Montecillo, State of Mexico.

Obtaining monoconidial isolates

From strawberries, leaves and stolons showing symptoms, portions of tissue approximately 2 cm were selected from the area showing symptoms, washed with water, disinfected with a 1 % sodium hypochlorite solution for 2-3 minutes, and rinsed with sterile distilled water. They were then dried in a laminar flow cabinet and grown on potato-dextrose-agar (PDA) (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152, USA). From the stock cultures, monoconidial cultures were prepared using serial dilutions; the conidia were placed on 2 % water agar (WA) and incubated for 10-18 hours at room temperature. Later, using a dissection needle, the germinated conidia were extracted one by one and placed in Petri dishes containing PDA. The monosporic isolates (Table 1) were stored at 4° C and later used in fungicide sensitivity tests.

Molecular identification

Monoconidial isolates from the Maravatío (8 isolates) and Zamora (11 isolates) valleys were selected. DNA extraction was carried out following the protocol of Doyle and Doyle (1990) with minor modifications. Later, through PCR, the ITS1, 5.8S and ITS2 regions of the ribosomal DNA were amplified using ITS5/ITS4 primers (White *et al.*, 1990) in a C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-

se pasaron a cajas de Petri con medio PDA. Estos aislados monospóricos (Cuadro 1) se almacenaron a 4 °C y fueron posteriormente usados en las pruebas de sensibilidad a fungicidas.

Identificación molecular

Para cada zona de muestreo, se seleccionaron 8 aislados monoconidiales del valle de Maravatío y 11 del valle de Zamora. La extracción de DNA se realizó de acuerdo al protocolo de Doyle y Doyle

Rad, USA) as follows: initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles at 95° for 2 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final extension at 72 °C for 2 min. Later, the PCR products were cleaned using a QIAquick purification kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed in MacroGen, Maryland, USA; then the sequences were edited in Bioedit Sequence Alignment Editor v.7.0.5 (Hall, 1999), and consensus sequences were generated. The

Cuadro 1. Aislados de *Colletotrichum acutatum* de acuerdo al cultivar, estructura y origen de colecta en campos de fresa durante 2009-2010.

Table 1. *Colletotrichum acutatum* isolates according to cultivar, structure and location where strawberries were collected in 2009-2010.

Aislado	Origen	Órgano	Variiedad	Aislado	Origen	Órgano	Variiedad
Ms38	Maravatío	Estolón	Albion	Ms41	Zamora	Fruto	Camino R
Ms39	Maravatío	Estolón	Albion	Ms44	Zamora	Fruto	Albion
Ms40	Maravatío	Estolón	Albion	Ms45	Zamora	Fruto	Albion
Ms1	Maravatío	Fruto	Albion	Ms46	Zamora	Fruto	Albion
Ms2	Maravatío	Fruto	Albion	Ms47	Zamora	Fruto	Albion
Ms3	Maravatío	Fruto	Albion	Ms48	Zamora	Fruto	Albion
Ms36	Maravatío	Fruto	Albion	Ms49	Zamora	Fruto	Albion
Ms15	Maravatío	Fruto	Festival	Ms51	Zamora	Fruto	Albion
Ms34	Maravatío	Fruto	Festival	Ms53	Zamora	Fruto	Festival
Ms30	Maravatío	Estolón	Camino R	Ms54	Zamora	Fruto	Festival
Ms31	Maravatío	Estolón	Camino R	Ms55	Zamora	Fruto	Festival
Ms32	Maravatío	Estolón	Camino R	Ms57	Zamora	Fruto	Albion
Ms33	Maravatío	Estolón	Camino R	Ms58	Zamora	Fruto	Albion
Ms6	Maravatío	Fruto	Albion	Ms59	Zamora	Fruto	Tioga
Ms7	Maravatío	Fruto	Albion	Ms60	Zamora	Fruto	Tioga
Ms9	Maravatío	Fruto	Albion	Ms61	Zamora	Fruto	Tioga
Ms11	Maravatío	Fruto	Festival	Ms63	Zamora	Fruto	Camino R
Ms12	Maravatío	Fruto	Festival	Ms64	Zamora	Fruto	Camino R
Ms13	Maravatío	Fruto	Festival	Ms65	Zamora	Fruto	Camino R
Ms14	Maravatío	Fruto	Festival	Ms66	Zamora	Fruto	Camino R
Ms16	Maravatío	Fruto	Camino R	Ms67	Zamora	Fruto	Camino R
Ms18	Maravatío	Fruto	Camino R	Ms70	Zamora	Fruto	Camino R
Ms28	Maravatío	Fruto	Camino R	Ms71	Zamora	Fruto	Festival
Ms20	Maravatío	Hoja	Albion	Ms72	Zamora	Fruto	Festival
Ms21	Maravatío	Hoja	Albion	Ms73	Zamora	Fruto	Festival
Ms22	Maravatío	Hoja	Albion	Ms74	Zamora	Fruto	Festival
Ms23	Maravatío	Hoja	Albion	Ms75	Zamora	Fruto	Festival
Ms25	Maravatío	Fruto	Festival	Ms76	Zamora	Fruto	Festival
Ms26	Maravatío	Fruto	Festival	Ms77	Zamora	Fruto	Albion
Ms27	Maravatío	Fruto	Festival	Ms79	Zamora	Fruto	Albion

(1990) con ligeras modificaciones. Posteriormente por PCR se realizó la amplificación de la región ITS1, 5.8S e ITS2 del DNA ribosomal con los iniciadores ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990) en un termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos con 95° por 2 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 2 min. Posteriormente, se realizó la limpieza de los productos de PCR con el kit de purificación QIAquick (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en Macrogen, (Maryland, USA). Las secuencias se editaron mediante el programa Bioedit Sequence Alignment Editor v.7.0.5 (Hall, 1999) y se crearon secuencias consenso. Estas secuencias se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del Genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el programa BLASTNucleotide (Zhang *et al.*, 2000) considerando el valor más alto de las comparaciones realizadas.

Aplicación de Fungicidas

Para los estudios, se usaron formulaciones comerciales de metil tiofanato del grupo químico benzimidazoles (Cercobin M[®], BASF Mexicana, Zapopan, Jalisco), a una concentración de 70 % y el azoxystrobin de grupo químico inhibidores externos de la quinona (QoI), Amistar[®] a una concentración del 50 % de ingrediente activo (Syngenta Agro S.A de C.V. México, D.F.).

Preparación de soluciones madre y medio de cultivo enmendado

Se prepararon soluciones madre de cada uno de los fungicidas, con base en el ingrediente activo

sequences were then compared with the sequences stored in the Genbank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLASTNucleotide (Zhang *et al.*, 2000) program; we took into consideration the highest value resulting from the comparisons.

Fungicide application

Commercial formulations of thiophanate methyl from the benzimidazole group (Cercobin M[®], BASF Mexicana, Zapopan, Jalisco) at 70 % concentration were used in the tests, as well as azoxystrobin, which belongs to the group of quinone outside inhibitors (QoI) (Amistar[®]), at 50 % concentration of the active ingredient (Syngenta Agro S.A de C.V. México, D.F.).

Stock solutions and amended culture medium preparation

Stock solutions of each fungicide were prepared by mixing the active ingredient with sterile distilled water. Using the concentrated solution, 1:10 serial dilutions were prepared to logarithmically obtain the desired concentrations. The solution containing the corresponding fungicide concentration was added to the medium when it cooled to 50-60 °C, constantly stirring to ensure uniform homogenization, and immediately placed in 15 mL Petri dishes.

Mycelial growth test

Six doses of each fungicide were evaluated: 100, 10, 1, 0.1, 0.01 and 0.001 µg mL⁻¹ of azoxystrobin, and 2000, 1000, 100, 10, 1 and 0.1 µg mL⁻¹ of methyl thiophanate, plus an absolute tester to which no fungicide was added. From the margins of 6-day old active colonies of each of

en agua destilada estéril. A partir de esta solución concentrada se hicieron diluciones seriales 1:10 para obtener las concentraciones deseadas en forma logarítmica. La solución con la concentración correspondiente de fungicida se adicionó al medio cuando este se enfrió a una temperatura entre 50 y 60 °C, agitando constantemente para un buen homogenizado y se vació inmediatamente en cajas de Petri, con un volumen de 15 mL.

Ensayo de crecimiento micelial

Se evaluaron 6 dosis de cada fungicida: 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para azoxystrobin y 2000, 1000, 100, 10, 1 y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para metil tiofanato, más un testigo absoluto al que no se le agregó fungicida. Del margen de colonias activas de 6 días de crecimiento de cada uno de los aislados monoconidiales se obtuvieron discos de 0.5 cm de diámetro y se colocaron en el centro de cajas de Petri de 90 x 15 mm con medio de cultivo adicionado con el fungicida. Se realizaron 3 repeticiones (cajas de Petri) de cada dosis. Las cajas se incubaron en obscuridad a temperatura ambiente (20±4 °C) por 5 días. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro de las colonias en dos direcciones en forma perpendicular y se obtuvo el promedio.

Ensayo de germinación de conidios

Se evaluaron las mismas 6 dosis de cada fungicida, más un testigo al que no se le agregó fungicida. Se consideraron tres repeticiones para cada dosis (cajas de Petri de 50 x 15 mm). Se prepararon suspensiones monoconidiales a una concentración de 10^3 a 10^4 conidios mL^{-1} . Estas suspensiones se sembraron en medio de cultivo AA al 2 % adicionado con fungicida, solo como superficie de germinación, preparado de la misma forma que en la fase de inhibición de crecimiento micelial. Se cuantificó

the monoconidial isolates, we obtained disks 0.5 cm in diameter, which were placed in the middle of 90 x 15 mm Petri dishes containing culture medium to which the fungicide had been added. Three replications (Petri dishes) of each dose were prepared. The dishes were incubated in darkness at room temperature (20±4 °C) for five days. After this period, the diameters of the colonies were measured perpendicularly in two directions to obtain the average.

Conidia germination test

The same six doses of each fungicide were evaluated, plus a tester to which no fungicide was added. Three replications of each dose (50x15 mm Petri dishes) were used. Monoconidial suspensions were prepared at concentrations of 10^3 to 10^4 conidia mL^{-1} . The suspensions were grown in 2 % WA culture medium to which fungicide had been added, only as a germination surface, prepared in the same way as in the mycelial growth inhibition stage. Six hours after being sown, the number of germinated and non-germinated conidia in each replication of a 100-conidia random sample were counted. A conidium was considered germinated when the length of its germ tube was 2 times greater than the diameter of the conidium.

Estimation of effective doses 50 (ED_{50}) and data analysis

Based on the two measurements of the diameter of the colony during the mycelial growth tests, we obtained the average, and after the three replications (Petri dishes) —which were used to calculate growth or germination compared to the control per each fungicide dose and isolate, we adjusted the model and estimated the ED_{50} using the log- Logistic model with upper asymptote using the

el número de conidios germinados y no germinados en cada una de las repeticiones de una muestra al azar de 100 conidios, 6 horas después de la siembra. Un conidio, se consideró germinado, si la longitud del tubo germinativo fue 2 veces mayor al diámetro del conidio.

Estimación de la dosis efectiva 50 (DE₅₀) y análisis de datos

De las 2 mediciones del diámetro de la colonia en los ensayos de crecimiento micelial se obtuvo el promedio, y después de las 3 repeticiones (cajas de Petri), la cual se usó para calcular el crecimiento o germinación relativa al testigo por cada dosis de fungicida y por cada aislamiento y se procedió al ajuste del modelo y estimación de las DE₅₀ usando para ello el modelo log-logístico con asíntota superior con el procedimiento NLMIXED de SAS (Statistical Analysis System versión 9.3). El modelo se expresa como:

$$y = \frac{\alpha}{1 + \text{Exp}\left(\beta \log\left(\frac{\text{Dosis}}{\text{DE}_{50}}\right)\right)}$$

Donde y es el crecimiento relativo de micelio o la germinación relativa de conidios, α la asíntota superior (máximo valor posible de y), β es la pendiente en el punto de inflexión y DE₅₀ es la dosis a la cual el crecimiento/germinación es reducido en 50 % (Schabenberguer y Pierce, 2001; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). Debido a que no todos los valores de inicio resultaron en la convergencia para todos los aislados, se exploraron diferentes conjuntos de valores al inicio de las iteraciones a fin de alcanzar convergencia. El ajuste del modelo se comprobó considerando el patrón de residuales para cada uno de los aislados (Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). Una

NLMIXED procedure of SAS (Statistical Analysis System version 9.3). The model is expressed as follows:

$$y = \frac{\alpha}{1 + \text{Exp}\left(\beta \log\left(\frac{\text{Dose}}{\text{ED}_{50}}\right)\right)}$$

Where y denotes relative mycelial growth or relative conidial germination, α is the upper asymptote (maximum y value possible), β the slope at the inflection point, and ED₅₀ the dose at which growth/germination is reduced by 50% (Schabenberguer and Pierce, 2001; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). Given that not all the initial values resulted in convergence for all the isolates, different sets of values were explored at the beginning of the iterations in order to achieve convergence. The adjustment to the model was confirmed considering the residuals pattern for each isolate (Rebollar-Alviter *et al.*, 2007). Once ED₅₀ was estimated, an exploratory data analysis was conducted, and the sensitivity distributions were illustrated with frequency histograms.

Before estimating the statistical moments, normality tests were conducted on the original data, and the ED₅₀ values were converted to 10-base logarithms. The estimated moment, the dispersion of basic statistics, the bias or misalignment parameters and the normality tests were conducted using the Proc univariate included in SAS software (version 9.3). Once the general sensitivity distribution of the two strawberry producing areas was explored, the data from each area were individually analyzed to determine significant differences between the distributions in each strawberry producing valley in terms of the sensitivity of *C. acutatum* isolates. This was done because the two production areas may exert

vez que se estimó la DE_{50} se realizó un análisis exploratorio de los datos, y las distribuciones de la sensibilidad se ilustraron con histogramas de frecuencias.

Previo a la estimación de los momentos estadísticos, se realizaron pruebas de normalidad sobre los datos originales y transformados a logaritmo base 10 los valores de las DE_{50} . El momento estimado, mediciones de dispersión de estadística básica y parámetros de sesgo o desalineado y pruebas de normalidad se realizaron con el Proc univariate incluido en el software SAS (ver 9.3). Una vez que se exploró la distribución de la sensibilidad general de las 2 zonas productoras de fresa, los datos de cada zona se analizaron por separado, a fin de determinar diferencias significativas entre las distribuciones de cada valle productor de fresa en relación a la sensibilidad de los aislados de *C. acutatum*. Lo anterior, en virtud de que ambas zonas de producción podrían ejercer diferentes niveles de presión de selección al tener niveles tecnológicos contrastantes. Esta comparación se realizó con base en la prueba de Kolmogorov-Smirnov, a fin de probar si las distribuciones provenían de una sola población o de poblaciones diferentes usando el procedimiento NPAR1WAY (SAS ver 9.3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica y molecular de aislados

Todos los aislados del patógeno asociado a los frutos con síntomas y daños de antracnosis obtenidos de las dos regiones productoras de fresa en Michoacán correspondieron a *Colletotrichum acutatum*. Los aislados, se caracterizaron por la formación de colonias de color blanco, con el centro gris

different levels of selection pressure due to their contrasting technology levels. The comparison was made using the Kolmogorov-Smirnov test and the NPAR1WAY (SAS version 9.3) procedure to determine whether the distributions came from a single population or different populations.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological and molecular identification of isolates

All the pathogen isolates associated with strawberries showing anthracnose symptoms and damage collected in the two strawberry producing areas of Michoacán proved to be *Colletotrichum acutatum*. The isolates were characterized by forming white colonies with dark gray centers and concentric orange circles both at the center and at the edges. The conidia were smooth, unicellular, aseptate, spindle-shaped and measured 10-14 x 4-6µm, and similar to those reported by Damm *et al.* (2012). The sequences obtained by PCR amplification of the region included in the Internal Transcribed Spacer (ITS) of the rDNA of the 20 isolates were 99 % identical to the AM991131 and AY266405 accessions placed in the NCBI's GenBank.

ED_{50} estimation

The log-Logistic model properly described the data of the dose-response to the fungicides used in this experiment for each of the isolates used. An example of ED_{50} estimation in the Ms12 isolate in response to mycelial growth using azoxystrobin is shown in Figure 1. This model has proved to be very useful for estimating ED_{50} when studying fungicide resistance and for detecting the hormesis

oscuro, destacando la presencia de coloraciones anaranjadas concéntricas tanto en centro como en las márgenes. Los conidios fueron lisos, unicelulares, aseptados, fusiformes y de 10-14 x 4-6µm, similar a los reportados por Damm *et al.* (2012). Las secuencias obtenidas producto de la amplificación por PCR de la región comprendida en el Espacio Transcrito Interno (ITS) del rDNA de los 20 aislados tuvieron 99 % de identidad con las accesiones AM991131 y AY266405 depositadas en el GenBank del NCBI.

Estimación de las DE_{50}

El modelo log-logístico describió adecuadamente los datos de dosis respuesta a los fungicidas usados en este estudio, para cada uno de los aislados usados. Un ejemplo de la estimación de la DE_{50} en el aislado Ms12 en respuesta al crecimiento micelial con el fungicida azoxystrobin se muestra en la Figura 1. Este modelo se ha encontrado útil para

phenomenon in these compounds (Schabenberger and Pierce, 2001; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007; Flores and Garzon, 2013).

Distribution of the sensitivity of *C. acutatum* isolates to thiophanate methyl

The sensitivity of *C. acutatum* isolates to thiophanate methyl at the mycelial stage ranged from one 0.28 to 9.72 µg mL⁻¹ dose of ED₅₀ with an average dose of 2.39 µg mL⁻¹ for the Maravatío valley, but it fit a normal distribution when the data were converted to the base-10 logarithm. The distribution of sensitivity in Zamora had a normal distribution and thus no data transformation of any type was required (Figure 2); its values ranged from 1.39 to 2.99 µg mL⁻¹, and were similar to the ones obtained for Maravatío. In the case of conidia, their ED₅₀ doses showed a wide distribution ranging from 0.9 to 396.4 µg mL⁻¹, with a mean of 20.9 µg mL⁻¹ for the Maravatío valley; the values for the Zamora

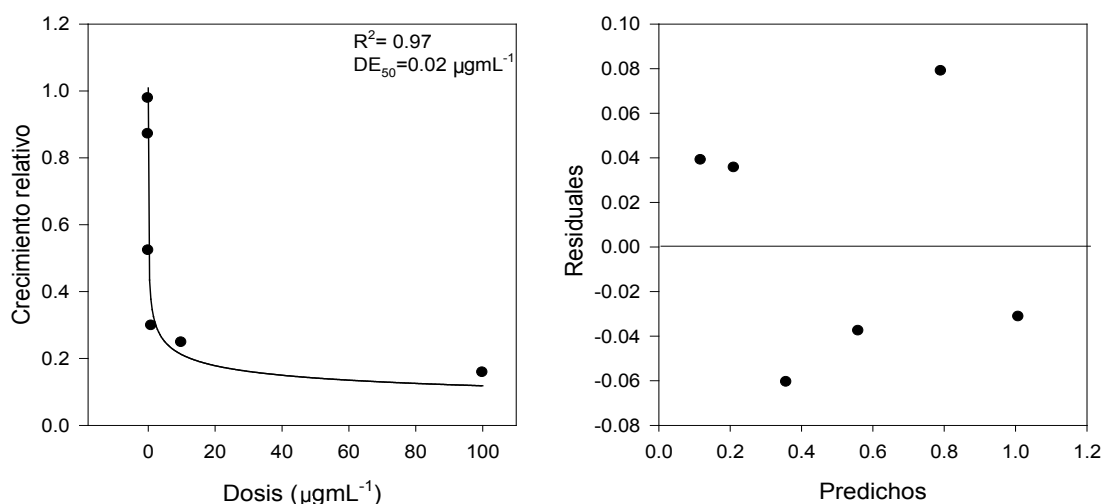


Figura 1. Ejemplo del ajuste del modelo Log-Logístico con asíntota superior al crecimiento micelial relativo con el fungicida azoxystrobin en un aislado de *Colletotrichum acutatum* representativo de la zona productora de fresa de Maravatío, Michoacán.

Figure 1. Example of the Log-Logistic model adjustment with an asymptote greater than the relative mycelial growth using azoxystrobin in a *Colletotrichum acutatum* isolate representative from the strawberry producing area in Maravatío, Michoacán.

la estimación de DE_{50} en el estudio de resistencia a fungicidas y la detección del fenómeno de hormesis en estos compuestos (Schabenberger y Pierce, 2001; Rebollar-Alviter *et al.*, 2007; Flores y Garzon, 2013).

Distribución de la sensibilidad de aislados de *C. acutatum* al metil tiofanato

La sensibilidad de los aislados de *C. acutatum* al metil tiofanato, en etapa de micelio varió entre una dosis DE_{50} de 0.28 a $9.72 \mu\text{g mL}^{-1}$, con una mediana de $2.39 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el valle de Maravatío, ajustándose a una distribución normal cuando se realizó la transformación de los datos al logaritmo base 10. Por su parte la distribución de la sensibilidad en Zamora se ajustó a una distribución normal y no requirió del uso de ningún tipo de transformación (Figura 2) con valores que variaron desde 1.39 a $2.99 \mu\text{g mL}^{-1}$, similar a los obtenidos en Maravatío. En el caso de conidios, las DE_{50} presentaron una distribución amplia desde 0.9 a $396.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ con una mediana de $20.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el Valle de Maravatío, mientras que para el Valle de Zamora se obtuvieron valores más bajos variando desde 0.43 a $63.32 \mu\text{g mL}^{-1}$ con una media 10.9 y una mediana de $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro 2). Al respecto, no hubo diferencias significativas entre las distribuciones de la sensibilidad en ambos valles para el caso de micelio ($Pr > K_{sa} = 0.13$), pero sí para el caso de los conidios ($Pr > K_{sa} = 0.0004$). Sin embargo, considerando el modo de acción del metil tiofanato, el crecimiento micelial es el proceso que refleja con mayor precisión la sensibilidad de los aislados, ya que el grupo de los benzimidazoles ejerce su acción al unirse a las subunidades de la proteína β -tubulina (*TUB2*), lo cual afecta el ensamble de los microtúbulos y por lo tanto, interfiere con procesos como la mitosis y formación del citoesqueleto que se manifiesta más directamente en la división celular (Ishii, 2012),

valley were lower and ranged from 0.43 to $63.32 \mu\text{g mL}^{-1}$, with an average of 10.9 and a median of $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 2). In this case, there were no significant differences between the sensitivity distribution in both valleys for mycelium ($Pr > K_{sa} = 0.13$), but there were significant differences for conidia ($Pr > K_{sa} = 0.0004$). However, considering the mode of action of thiophanate methyl, mycelial growth is the process that most precisely reflects the isolates' sensitivity, since benzimidazoles act by joining the subunits of the β -tubulin (*TUB2*) protein, which affects the microtubule assembly, and therefore interferes with processes such as mitosis and cytoskeletal formation. This is directly manifested in cell division (Ishii, 2012); point mutations at this site result in a lack of effectiveness in the field (Ma and Michailidis, 2005).

In studies conducted by Peres *et al.* (2004) using *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* obtained from citrus, the authors found that in the case of benomyl (benzimidazole), *C. acutatum* isolates were moderately resistant, since their growth was inhibited by approximately 55 % at $DE_{50} = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ and 80 % at $DE_{50} = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$. The latter isolates showed point mutations in the *TUB2* gene. Chung *et al.* (2006) studied different *Colletotrichum* species and reported that in *C. acutatum* isolates they estimated ED_{50} between 1 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of thiophanate methyl, indicating that they were more resistant than *C. gloeosporioides*. Kim *et al.* (2007) also reported using ED_{50} doses between 3.8 and $8.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ in *C. acutatum* isolates obtained from chili in concentrations higher than $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, but found no point mutations in the *TUB2* gene. The results of our study show that, based on mycelial growth, the isolates from both strawberry producing areas showed ED_{50} no higher than $3 \mu\text{g mL}^{-1}$. For this reason, it may be considered that *C. acutatum* populations have moderate resistance to benzimidazole fungicides such as thiophanate

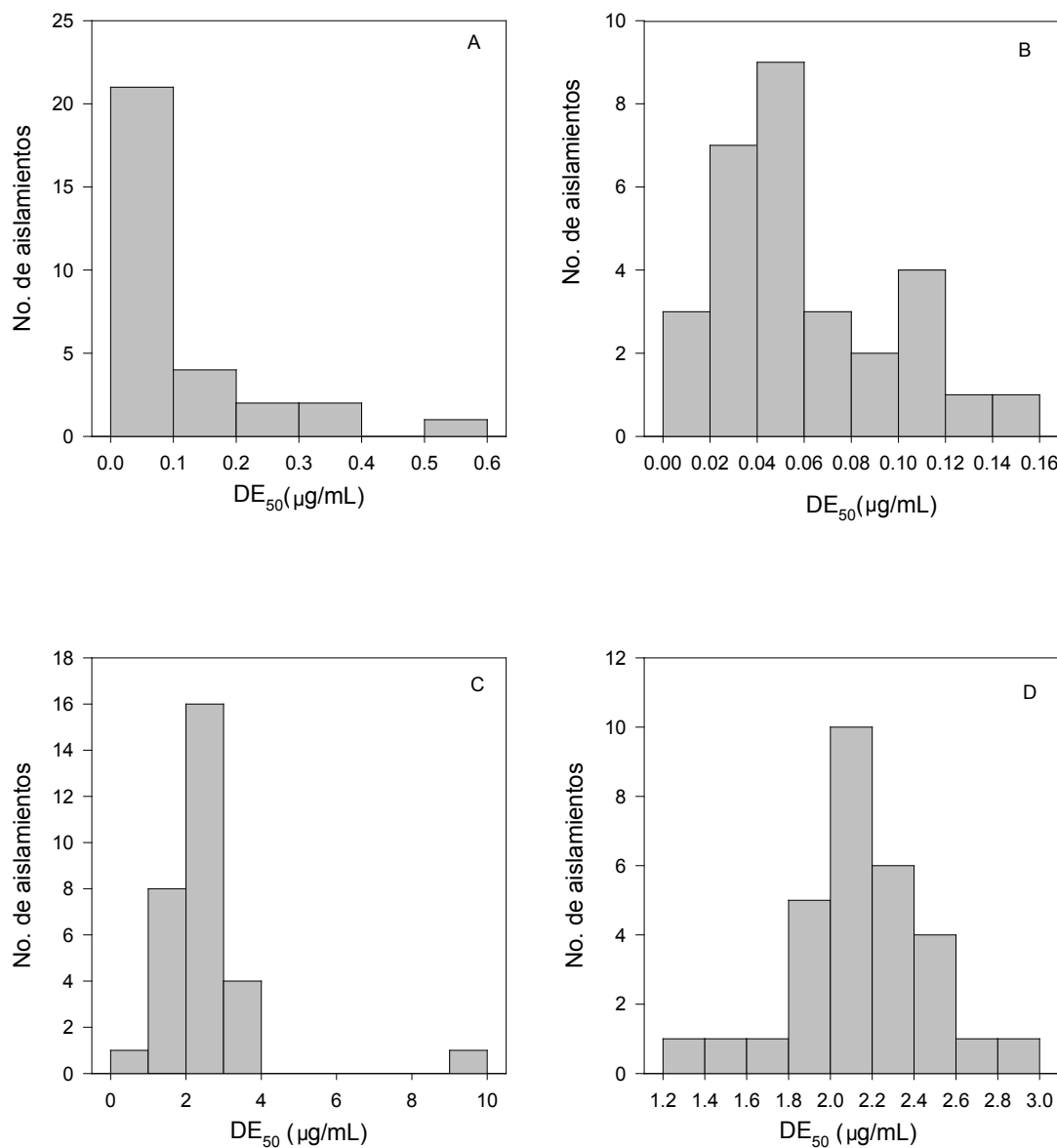


Figura 2. Distribución de la sensibilidad de *Colletotrichum acutatum* al fungicida azoxystrobin para la prueba de germinación de conidios. A= Valle de Maravatío, B= Valle de Zamora. Distribución de la sensibilidad al metil tiofanato (micelio), C= Valle de Maravatío, D= Valle de Zamora.

Figure 2. Sensitivity distribution of *Colletotrichum acutatum* to azoxystrobin fungicide for conidia germination test. A= Maravatío valley; B= Zamora valley. Sensitivity distribution to thiophanate methyl (mycelium), C= Maravatío valley; D= Zamora valley.

mutaciones puntuales en este sitio, resultan en falta de eficacia en campo (Ma y Michailidis, 2005).

Estudios realizado por Peres *et al.* (2004) en *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* obtenidos de cítricos,

methyl, and more likely to benomyl, because of they share the same mode action, as previously shown (Peres *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2010). These results suggest the need to implement

Cuadro 2. Estadística básica y momentos de los valores de DE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para el fungicida metil tiofanato en micelio y conidios de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora, Michoacán.
Table 2. Basic statistics and moments of ED_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) values for thiophanate methyl in *Colletotrichum acutatum* mycelium and conidia obtained from strawberries collected in Maravatío and Zamora, Michoacán.

Variable	Origen	Media	DS [*]	Mínimo	Máximo	Mediana	Rango	Skewness	Kurtosis
Micelio	Maravatío	2.46	1.52	0.28	9.72	2.39	9.42	3.78	18.36
	Zamora	2.17	0.32	1.39	2.99	2.16	1.59	-0.11	0.97
Conidios	Maravatío	50.4	84.2	0.9	396.4	20.9	395.5	3.1	10.31
	Zamora	10.94	15.17	0.43	63.75	5.0	63.32	2.28	5.21

^{*}Desviación estándar / Standard deviation.

encontraron que para el caso del benomil (banzimidazol), los aislados de *C. acutatum* fueron moderadamente resistentes, pues el crecimiento de alrededor del 55 % se inhibió a una $DE_{50} = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de 80 % a $DE_{50} = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$, estos últimos aislados tuvieron mutaciones de punto en el gen *TUB2*. Chung *et al.* (2006), estudiando diferentes especies de *Colletotrichum* reportaron que en los aislados de *C. acutatum* se estimaron DE_{50} entre 1 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metil tiofanato, siendo en general más resistentes que *C. gloeosporioides*. En el mismo sentido, Kim *et al.* (2007) reportaron DE_{50} entre 3.8 y $8.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ en aislados de *C. acutatum* de Chile con concentraciones de más de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, pero no encontraron mutaciones puntuales en el gen *TUB2*. Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que en los aislados de ambas zonas productoras de fresa con base en el crecimiento micelial, las DE_{50} no superaron los $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, por lo que puede considerarse que las poblaciones de *C. acutatum* manifiestan una resistencia moderada a fungicidas benzimidazoles como el metil tiofanato, y muy probablemente al benomil, dado el mismo modo de acción como se ha demostrado previamente (Peres *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren la necesidad de implementar estrategias de manejo de resistencia a benzimidazoles en las zonas de estudio dada la estabilidad que se ha aso-

benzimidazole resistance management strategies in the study areas given the stability found in some fungi such as *Botrytis cinerea* (Hollomon, 2015); among these strategies are the use of fungicide mixtures or alternating fungicides of different mode of action and not using them for eradication purposes (after symptom development) (Brent and Derek, 2007).

Distribution of the sensitivity of *C. acutatum* isolates to azoxystrobin

The distribution of the sensitivity to azoxystrobin of *C. acutatum* isolates in mycelium ranged between 0.04 to $0.36 \mu\text{g mL}^{-1} ED_{50}$, with a median of $0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the Maravatío valley, while in the Zamora valley, the ED_{50} values ranged from 0.07 to $0.99 \mu\text{g mL}^{-1}$, with the same median value. For conidia, the estimated ED_{50} ranged from 0.01 to $0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.006 a 0.15 , with a median of 0.05 and $0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$, for Maravatío and Zamora, respectively (Table 3; Figure 2). Converting the ED_{50} values to base-10 logarithms satisfactorily normalized the distribution curve, except for the isolates from Zamora in the mycelium sensitivity test. The Kolmogorov-Smirnov test used to compare the two sensitivity distributions (for conidia and mycelium) did not show significant differences between the two

ciado en algunos hongos como *Botrytis cinerea* (Hollomon, 2015); entre ellas, el uso de mezclas o alternaciones con fungicidas de modo de acción diferente y evitar el uso con fines erradicantes (post-desarrollo de síntomas) (Brent and Derek, 2007).

Distribución de la sensibilidad de aislados de *C. acutatum* al azoxystrobin

La distribución de la sensibilidad al azoxystrobin de los aislados de *C. acutatum*, en micelio varió entre una DE_{50} de 0.04 a 0.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con una mediana de 0.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el valle de Maravatío, mientras que en el valle de Zamora los valores de DE_{50} variaron desde 0.07 a 0.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con el mismo valor de la mediana. Para los conidios, las DE_{50} estimadas variaron entre 0.01 a 0.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0.006 a 0.15 con una mediana de 0.05 y 0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para el valle de Maravatío y Zamora respectivamente (Cuadro 3; Figura 2). La transformación de los valores de DE_{50} a logaritmo base 10, normalizaron satisfactoriamente la curva de distribución excepto para los aislados de Zamora en la prueba de sensibilidad de micelio. La prueba de Kolmogorov-Smirnov, para la comparación de las dos distribuciones de la sensibilidad para conidios y para micelio no indicó diferencias significativas entre las zonas de estudio ($Pr > Ks = 0.58$, para conidios; $Pr > Ks = 0.79$ para micelio).

study areas ($Pr > Ks = 0.58$ for conidia; $Pr > Ks = 0.79$ for mycelium).

Mondal *et al.* (2005) reported ED_{50} base values of 0.09 to 0.99 with a median of 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of azoxystrobin for *C. acutatum* mycelia obtained from citrus in Florida. Based on these results, they selected discriminatory doses of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Later, Forcelini *et al.* (2016) determined that azoxystrobin sensitivity in *C. acutatum* isolates obtained from strawberry in Florida was 0.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. According to the authors, isolates showing inhibition up to $ED_{50} = 3 \mu\text{g mL}^{-1}$ were considered sensitive; those with up to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were considered moderately resistant, and those with sensitivity higher than 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were considered completely resistant. Moderately resistant isolates were associated with point mutations at codon 129 of the cytochrome *bcl* gene, where the amino acid phenylalanine changed to leucine (F129L), while in the highly resistant isolates, the mutation was associated with the change from the amino acid glycine to alanine (G143A). Based on these studies, we may conclude that all the isolates tested in this study are sensitive to azoxystrobin, since the data show no evidence of resistance in the two strawberry producing areas studied based on ED_{50} distribution, although this active ingredient and other molecules of the same group have been in the Mexican market for over 10 years. However, given that this group is considered

Cuadro 3. Estadística básica y momentos de los valores de DE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para el fungicida azoxystrobin en micelio y conidios de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora.

Table 3. Basic statistics and moments of ED_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) values for azoxystrobin in *Colletotrichum acutatum* mycelium and conidia obtained from strawberries collected in Maravatío and Zamora valleys.

Variable	Origen	Media	DS ^x	Mínimo	Máximo	Mediana	Rango	Skewness	Kurtosis
Micelio	Maravatío	0.14	0.07	0.04	0.36	0.12	0.31	1.22	1.83
	Zamora	0.17	0.17	0.07	0.99	0.12	0.92	4.06	19.15
Conidios	Maravatío	0.10	0.12	0.01	0.56	0.05	0.55	2.31	5.69
	Zamora	0.05	0.03	0.006	0.15	0.04	0.14	0.85	0.21

^xDesviación estándar / Standard deviation.

Mondal *et al.* (2005) reportaron valores base de DE_{50} de 0.09 a 0.99 con una media de $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de azoxistrobin para micelio de *C. acutatum* obtenidos de cítricos en Florida; con base en estos resultados seleccionaron una dosis discriminatoria de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente Forcelini *et al.* (2016), determinaron que la sensibilidad al azoxystrobin en aislados de *C. acutatum* obtenidos de fresa en Florida fue de $0.30 \mu\text{g mL}^{-1}$. De acuerdo con los autores, los aislados que mostraron inhibición hasta una $DE_{50} = 3 \mu\text{g mL}^{-1}$ se consideraron sensibles; hasta $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, se consideraron moderadamente resistentes y superior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, se consideraron completamente resistentes. Los aislados moderadamente resistentes se asociaron a las mutaciones de punto en el codón 129 del gen citocromo *bcl* en el cual hay un cambio del aminoácido fenilalanina a leucina (F129L), mientras que en los aislados altamente resistentes, la mutación se asoció a un cambio del aminoácido glicina a alanina (G143A). Con base en estos estudios, es factibles concluir que todos los aislados probados en este estudio son sensibles al azoxystrobin, pues los datos no indican evidencias de resistencia en las dos zonas productoras de fresa estudiadas con base en la distribución de las ED_{50} , a pesar de que este ingrediente activo y otras moléculas del mismo grupo han estado en el mercado en México por más de 10 años. Sin embargo, siendo un grupo considerado como de alto riesgo para la inducción de resistencia en hongos, es necesario la implementación de estrategias de manejo de resistencia (Hollomon, 2015) a fin de prevenir el un cambio en la distribución de la sensibilidad en el corto o mediano plazo. Esta implementación de estrategias de manejo de la resistencia debe tomar en cuenta principios generales que gobiernan el desarrollo de cepas resistentes (van den Bosch *et al.*, 2014).

to be high risk because it induces resistance in fungi, it is necessary to implement resistance management strategies (Hollomon, 2015) in order to avoid changes in sensitivity distribution in the short and long term. The implementation of resistance management strategies must take into account general principles that determine the development of resistant isolates (van den Bosch *et al.*, 2014).

CONCLUSIONS

The sensitivity of *C. acutatum* isolates to thiophanate methyl based on mycelium ranged from ED_{50} 0.28 to $9.72 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the Maravatío valley, and from 1.39 to $2.99 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the Zamora valley; for conidia ED_{50} ranged from 0.9 to $396.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the Maravatío valley, and from 0.43 to $63.32 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the Zamora valley.

As for azoxystrobin in mycelium, the ED_{50} ranged from 0.04 to $0.36 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the Maravatío valley, and from 0.07 to $0.99 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the Zamora valley. In conidia, ED_{50} ranged from 0.01 to $0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the Maravatío valley, and from 0.006 to $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the Zamora valley.

The data obtained based on sensitivity distribution (ED_{50}) show that the *C. acutatum* isolates from Maravatío and Zamora, Michoacán, showed moderate resistance to thiophanate methyl, and complete sensitivity to azoxystrobin. In both cases, it is necessary to implement strategies for managing resistance to benzimidazole and strobirulin fungicides.

CONCLUSIONES

La sensibilidad de los aislados de *C. acutatum* al metil tiofanato basado en micelio varió entre una DE_{50} de 0.28 a 9.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el Valle de Maravatío y de 1.39 a 2.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el Valle de Zamora, mientras que en conidios varió entre una DE_{50} de 0.9 a 396.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el Valle de Maravatío y de 0.43 a 63.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el Valle de Zamora.

Con respecto al azoxystrobin en micelio la DE_{50} varió entre 0.04 a 0.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en Maravatío y de 0.07 a 0.99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el Valle de Zamora. En conidios, la DE_{50} varió de 0.01 a 0.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el Valle de Maravatío y 0.006 a 0.15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el Valle de Zamora.

Los datos obtenidos con base en la distribución de la sensibilidad (DE_{50}) indican que los aislados de *C. acutatum* obtenidos del Valle de Maravatío y Zamora Michoacán mostraron resistencia moderada al metil tiofanato y sensibilidad completa al azoxystrobin. En ambos casos se hace necesaria la implementación de estrategias de manejo de la resistencia a fungicidas benzimidazoles y estrobilurinas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada al primer autor para los estudios de posgrado en Protección Vegetal en la Universidad Autónoma Chapingo.

LITERATURA CITADA

- Brent KJ and Hollomon DW. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?. Fungicide Resistance Action Committee. Frac Monograph no. 1. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf>
- Chung WH, Ishii H, Nishimura K, Fukaya M, Yano K and Kajitani Y. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, for funding the first author's postgraduate studies in Plant Protection at the Universidad Autónoma Chapingo.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- crops in Japan. Plant Disease 90:506-512. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0506>
- Costet-Costet M. 2015. Monitoring resistance in obligate pathogens by bioassays relating to field use: grapevine powdery and downy mildews. Pp: 251-280 in: Ishii H, and Hollomon WWF (eds). Fungicide resistance in plant pathogens. Springer, Japan. 485 pp. <http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8>
- Damm U, Cannon PF, Wouldenberg JHC and Crous PW. 2012. The *Colletotrichum* species complex. Studies in Mycology 73:37-113. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0010>
- Doyle JJ and Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10005384640>
- Flores FJ and Garzon C. 2013. Detection and assessment of chemical hormesis on the radial growth *in vitro* of Oomycetes and fungal pathogens. Dose-Response 11:361-373. <http://dx.doi.org/10.2203/dose-response.12-026.Garzon>
- Forcelini BB, Seijo TE, Amiri A and Peres NA. 2016. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone- outside inhibitor fungicides. Plant Disease 100:2050-2056. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0118-RE>
- Freeman S. 2008. Management, survival strategies, and host range of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Hort Science 43:66-68. <http://hortsci.ashspublishings.org/content/43/1.toc>
- Hammerschlag F, Garcés S and Koch-Dean M. 2006. *In vitro* response of strawberry cultivars and regenerants to *Colletotrichum acutatum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84:255. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-005-9027-5>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Hollomon DW. 2015. Fungicide resistance: facing the challenge. Plant Protection Science 51:170-176. <http://dx.doi.org/10.17221/42/2015-PPS>
- Ishii H. 2012. Resistance in *Venturia nashicola* to benzimidazole fungicides and sterol demethylation Inhibitors. Pp: 21-31. In: Thind, T. (ed). Fungicide resistance in crop protection. CAB International. UK. 297 pp. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845939052.0157>
- Kim Y, Min J, Kang B, Bach N, Choi W, Park E and Kim H. 2007. Analyses of the less benzimidazole-sensitivity of

- the isolates of *Colletotrichum* spp. causing the anthracnose in pepper and strawberry. The Plant Pathology Journal 23:187-192. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2007.23.3.187>.
- Ma Z and Michailides TJ. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection 24:853-863. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>.
- Mondal SN, Bhatia A, Shilts T and Timmer LW. 2005. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin and fenbuconazole. Plant Disease 89:1186-1194. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-1186>
- Parikka P and Lemetty A. 2009. *Colletotrichum acutatum*: survival in plant debris and infection of some weeds and cultivated plants. Acta Horticulturae 842:307-310. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.842.55>
- Peres NAR, Souza NL, Peever TL and Timmer LW. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. Plant Disease 88:125-130. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.125>
- Rebollar-Alviter A, Madden LV, Jeffers SN and Ellis MA. 2007. Baseline and differential sensitivity to two QoI fungicides among isolates of *Phytophthora cactorum* that cause leather rot and crown rot on strawberry. Plant Disease 91:1625-1637. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1625>
- Schabenberger O and Pierce FJ. 2001. Contemporary Statistical Model for the Plant and Soil Science. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 738 p.
- SIAP. 2016. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción agrícola por Cultivo. <http://www.siap.gob.mx> (consulta en Marzo del 2016).
- Smith BJ. 2008. Epidemiology and pathology of strawberry anthracnose: A North American perspective. Hort Science 43:69-73. <http://hortsci.ashspublishations.org/content/43/1.toc>
- Turechek WW, Peres NAR and Werner NA. 2006. Pre- and post-infection activity of pyraclostrobin for control of anthracnose fruit rot of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease 90:862-868. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0862>
- Valero M, García-Martínez S, Giner MJ, Aranzazu A and Ruiz JJ. 2010. Benomyl sensitivity assays and species-specific PCR reactions highlight association of two *Colletotrichum gloeosporioides* types and *C. acutatum* with rumple disease on Primofiori lemons. European Journal of Plant Pathology 127:399-405. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-010-9606-0>
- van den Bosh F, Oliver R, van den Berg F and Paveley N. 2014. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. Annual Review of Phytopathology 52:175-195. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050158>
- Wedge D, Smith JN, Quebedeaux JP and Constantin RJ. 2007. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi. Crop Protection 26:1449-1558. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2006.12.007>
- Wharton SP and Diéguez-Uribeondo J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del jardín botánico de Madrid 61:3:22. <http://dx.doi.org/10.3989/ajbm.2004.v61.i1.61>
- White TJ, Bruns T, Lee S, and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. A guide to methods and applications. Pp. 315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols, Academic Press, Inc. San Diego, CA, USA. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7:203-214. <http://dx.doi.org/10.1089/10665270050081478>