

# ETIOLOGÍA Y CONTROL DE LA NECROSIS DE FLORES Y PUDRICIÓN DE FRUTOS DE PEPINO EN MORELOS, MÉXICO

Tania Núñez-Ríos<sup>1</sup>; Santos Gerardo Leyva-Mir<sup>2\*</sup>;  
Juan Enrique Rodríguez-Pérez<sup>1</sup>; Luis Antonio Mariscal-Amaro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México, MÉXICO. C. P. 56230.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola. km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México, MÉXICO. C. P. 56230.

Correo-e: lsantos@correo.chapingo.mx (\*Autor para correspondencia)

<sup>3</sup>Intituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío. km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende. Celaya, Guanajuato, MÉXICO. C. P. 38110.

## RESUMEN

Durante muestreos realizados en 2010, se observaron síntomas severos de necrosis de flores, tizón de hojas y pudrición de frutos en parcelas de pepino de Totolapan, Morelos, México. La incidencia de la enfermedad fluctuó entre 40 y 50 %. Se aislaron colonias fungosas a partir de hojas, flores y frutos sintomáticos colectados en diferentes sitios. Las características morfológicas de las colonias, conidios y esclerocios de los aislados fungosos fueron similares a *Botrytis cinerea*. Un aislado representativo de *B. cinerea* se seleccionó para análisis molecular mediante la amplificación de la región ITS. La patogenicidad del aislado se verificó mediante la inoculación de una suspensión conidial sobre 10 plántulas y 10 frutos de pepino. Cinco plántulas y frutos asperjados con agua destilada estéril sirvieron como control. Las plántulas y frutos control permanecieron sanos, mientras que los frutos inoculados con la suspensión de conidios desarrollaron lesiones grises a los cinco días después de la inoculación. *B. cinerea* se reisoló consistentemente a partir de hojas y frutos con lesiones. Con base en el aislamiento, identificación morfológica y molecular, así como pruebas de patogenicidad, se determinó a *B. cinerea* como el agente causal de la necrosis de flores, tizón de hojas y pudrición de frutos de pepino en Totolapan, Morelos, México. Adicionalmente, se evaluó la eficacia de cuatro fungicidas y del agente de biocontrol *T. harzianum* contra *B. cinerea* en plantas de pepino en invernadero. Los fungicidas clorotalonil y thiabendazol mostraron los más altos porcentajes de control. Los tratamientos químicos y la cepa de *T. harzianum* no redujeron significativamente la infección causada por *B. cinerea*.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** *Cucumis sativus*, *Botrytis cinerea*, *Botryotinia fuckeliana*, *Trichoderma harzianum*, fungicidas.

## ETIOLOGY AND CONTROL OF FLOWER NECROSIS AND FRUIT ROT IN CUCUMBER IN MORELOS, MEXICO

### ABSTRACT

During field surveys conducted in 2010, severe symptoms of leaf blight, flower necrosis and fruit rot were observed in cucumber fields in Totolapan, Morelos, Mexico. Disease incidence ranged between 40 and 50 %. Fungal colonies were isolated from symptomatic cucumber leaves, flowers and fruits collected from different fields. Morphological characteristics of the colonies, conidia, and sclerotia of these fungal isolates were similar to *Botrytis cinerea*. A representative isolate of *B. cinerea* was selected for molecular analysis by amplification of the ITS region. Pathogenicity of the representative isolate was tested by inoculation of a conidial suspension on 10 cucumber seedlings and 10 fruits. Five seedlings and fruits inoculated with sterile distilled water served as controls. Control seedlings and fruits remained healthy, but grey lesions on inoculated leaves and fruits were observed five days after inoculation. *B. cinerea* was consistently re-isolated from leaves and fruits with lesions. On the basis of the isolation, morphological and molecular identification, and pathogenicity tests, *B. cinerea* was determined to be the causal agent of leaf blight, flower necrosis and fruit rot in cucumber in Totolapan, Morelos, Mexico. Additionally, the efficacy of four fungicides and the bio-control agent *T. harzianum* against *B. cinerea* in cucumber plants was evaluated in a greenhouse test. The fungicides chlorothalonil and thiabendazole showed the highest percent control, but the chemical treatments and the strain of *T. harzianum* did not significantly reduce the symptoms caused by *B. cinerea*.

**ADDITIONAL KEYWORDS:** *Cucumis sativus*, *Botrytis cinerea*, *Botryotinia fuckeliana*, *Trichoderma harzianum*, fungicides.

## INTRODUCCIÓN

El pepino (*Cucumis sativus* L.) es una hortaliza de fruto que se consume en fresco. En el 2011, la superficie sembrada en México en sistemas de riego y temporal fue de 16,534 ha, de las que se obtuvo una producción total de 425,433 t de fruta. Los estados con mayor volumen de producción fueron Michoacán, Sinaloa y Sonora. El estado de Morelos fue el quinto productor de este cultivo con una superficie sembrada de 1,397 ha y una producción de 24,596 t (Anónimo, 2012).

*Botrytis cinerea* (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*) es un hongo fitopatógeno con habito necrotrófico que ataca alrededor de 200 cultivos a nivel mundial, principalmente en regiones templadas y subtropicales. Este patógeno es responsable de inducir una amplia variedad de síntomas, los cuales no pueden ser generalizados a través de los órganos y tejidos vegetales. Los síntomas típicos sobre hojas y frutos es una pudrición suave, acompañada de colapso del parénquima, y seguida por un rápido desarrollo de masas grises de conidios. En pepinos, calabacitas y fresas, la infección por *B. cinerea* comienza sobre flores senescentes y avanza como una pudrición suave que se dispersa y afecta el desarrollo de frutos adyacentes (Williamson *et al.*, 2007).

Este hongo patógeno es difícil de controlar debido a que presenta una gran variedad de modos de ataque, diversos hospedantes como fuente de inóculo, y puede sobrevivir como micelio, conidios y esclerocios en residuos de cultivos. Por estas razones, el uso de una simple medida de control no es suficiente, y se requiere de un conocimiento detallado sobre la interacción patógeno-hospedante, del microambiente en el cual se desarrolla el hongo y de sus competidores microbianos localizados en el hospedante (Williamson *et al.*, 2007).

Durante las últimas dos décadas, el método más efectivo para el control de *B. cinerea* ha sido el uso de fungicidas benzimidazoles, dicarboxamidas y multi-sitio. Sin embargo, esta estrategia de control es costosa, no garantiza el control de las enfermedades y existe riesgo de que los hongos generen resistencia (Lee *et al.*, 2006; Koike *et al.*, 2007).

Otra alternativa que se ha investigado extensivamente para el control de *B. cinerea* es la aplicación de agentes de biocontrol. Los organismos que han mostrado mayor potencial son *Trichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea*, *Ulocladium oudemansii*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, y *Candida oleophila* (Elad y Steward, 2007). *Trichoderma harzianum* es un agente de biocontrol eficiente que se usa contra patógenos bajo condiciones comerciales (Elad *et al.*, 1993; Dik y Elad, 1999; Howell, 2003). Algunos mecanismos que se han reportado como

## INTRODUCTION

The cucumber (*Cucumis sativus* L.) is a fruit vegetable that is consumed fresh. In 2011, the area planted in Mexico in irrigation and rain-fed systems was 16,534 ha, from which a total production of 425,433 t of fruit was obtained. The states with the largest production volume were Michoacán, Sinaloa and Sonora. The state of Morelos was the fifth largest producer of this crop with a planted area of 1,397 ha and production of 24,596 t (Anónimo, 2012).

*Botrytis cinerea* (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*) is a phytopathogenic fungus with a necrotrophic lifestyle that attacks about 200 crops worldwide, mainly in temperate and subtropical regions. This pathogen is responsible for inducing a wide variety of symptoms, which cannot be generalized through plant tissues and organs. The typical symptom on leaves and fruits is a soft rot, accompanied by parenchymal collapse, followed by rapid development of gray masses of conidia. In cucumbers, zucchinis and strawberries, infection by *B. cinerea* begins on senescent flowers and progresses as a soft rot that spreads and affects the development of adjacent fruits (Williamson *et al.*, 2007).

This fungal pathogen is difficult to control because it has a large variety of modes of attack, various hosts as a source of inoculum, and can survive as mycelium, conidia and sclerotia in crop residues. For these reasons, the use of a single control measure is not sufficient, and a detailed knowledge of the pathogen-host interaction, the microenvironment in which the fungus develops and its microbial competitors located in the host are required (Williamson *et al.*, 2007).

During the past two decades, the most effective method for controlling *B. cinerea* has been the use of benzimidazole, dicarboximide and multi-site fungicides. However, this control strategy is expensive, does not ensure disease control and runs the risk of generating resistance in the fungi (Lee *et al.*, 2006; Koike *et al.*, 2007).

Another alternative that has been extensively researched for the control of *B. cinerea* is the application of bio-control agents. The organisms that have shown the greatest potential are *Trichoderma harzianum*, *Clonostachys rosea*, *Ulocladium oudemansii*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, and *Candida oleophila* (Elad and Steward, 2007). *Trichoderma harzianum* is an effective bio-control agent used against pathogens under commercial conditions (Elad *et al.*, 1993; Dik and Elad, 1999; Howell, 2003). Some mechanisms that have been reported as responsible for pathogen control through the use of *Trichoderma* spp. are competition for space and nutrients, mycoparasitism, production of inhibitory compounds or antibiotics, suppression of sporulation and induced resistance (Dubos and Bulit, 1981; Belanger *et al.*, 1995; Zimand *et al.*, 1996).

responsables del control de patógenos mediante el uso de *Trichoderma* spp. son competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, producción de compuestos inhibidores o antibióticos, supresión de la esporulación y resistencia inducida (Dubos y Bulit, 1981; Belanger *et al.*, 1995; Zimand *et al.*, 1996).

En la zona productora de pepino a campo abierto de Totolapan, Morelos, México, se han observado síntomas severos de necrosis de flores, tizón de hojas y pudrición de frutos de pepino. Por lo anterior, los objetivos de este estudio fueron identificar al agente causal de los síntomas de necrosis, tizón y pudrición, mediante la combinación de análisis morfológicos, moleculares y patogénicos, y evaluar la efectividad de productos químicos y biológicos para el control de esta enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de muestras

Durante el ciclo de producción 2010, se recolectaron un total de 100 flores necrosadas, 50 hojas con síntoma de tizón y 50 frutos con pudrición gris oscuro en parcelas comerciales de pepino en Totolapan, Morelos, México, localizado a 18° 59' LN y 98° 54' LO. Las muestras se colocaron en bolsas de papel y se trasladaron al Laboratorio de Micología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo para su adecuado procesamiento.

### Aislamiento y purificación

Se realizaron cortes de tejido vegetal (hojas, flores y frutos) de 1 cm<sup>2</sup> a partir de la zona de transición entre el tejido enfermo y sano. Los fragmentos de tejido se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 % por 5 min, se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) al 2 %. Las cajas se incubaron a 24 °C bajo condiciones de luz negra continua. Las colonias fungosas más frecuentes se transfirieron a cajas Petri con PDA fresco y se incubaron hasta la formación de estructuras de reproducción (conidios y conidióforos). La obtención de cultivos monoconidiales se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Crous *et al.* (2009).

### Prueba de patogenicidad

Un aislado monoconidial del hongo que presentó la mayor frecuencia se inoculó en 10 plántulas y 10 frutos de pepino variedad Poinset 76. La inoculación en las plántulas se realizó 15 días después de la siembra cuando éstas presentaban la primera hoja verdadera. Los frutos de pepino se desinfectaron previamente en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % por 3 min. El inóculo del hongo se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios·ml<sup>-1</sup>

In commercial fields in the cucumber-producing area of Morelos, Mexico, severe symptoms of flower necrosis, leaf blight and fruit rot have been observed in cucumber. Therefore, the objectives of this study were to identify the causal agent of the symptoms of necrosis, blight and rot, through the combination of morphological, molecular and pathogenic analysis, and evaluate the efficacy of chemical and biological products for the control of this disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of samples

During the 2010 production cycle, a total of 100 necrotic flowers, 50 leaves with blight symptoms and 50 fruits with dark gray rot were collected in commercial cucumber fields in Totolapan, Morelos, Mexico, located at 18° 59' NL and 98° 54' WL. The samples were placed in paper bags and moved to the Agricultural Mycology Laboratory at the Universidad Autónoma Chapingo for proper processing.

### Isolation and purification

Plant tissue samples (leaves, flowers and fruits) of 1 cm<sup>2</sup> were cut from the transition zone between healthy and diseased tissue. Tissue fragments were disinfected with 3 % sodium hypochlorite for 5 min, rinsed with sterile distilled water three times and transferred to Petri dishes containing 2 % potato dextrose agar (PDA) culture medium. The dishes were incubated at 24 °C under continuous black light. The most common fungal colonies were transferred to Petri dishes with fresh PDA and incubated until the formation of reproductive structures (conidia and conidiophores). Monoconidial cultures were obtained by following the methodology described by Crous *et al.* (2009).

### Pathogenicity test

A monoconidial isolate of the fungus that presented the highest frequency was inoculated in 10 Poinsett 76 variety cucumber seedlings and 10 fruits. The inoculation in the seedlings took place 15 days after planting when they presented the first true leaf. The cucumber fruits were previously disinfected in a 1 % sodium hypochlorite solution for 3 min. The fungus inoculum was adjusted to a concentration of  $1 \times 10^6$  conidia·ml<sup>-1</sup> using a Neubauer chamber for spore counting. Then 2 ml of the surfactant Tween 20™ was added per liter of sterile distilled water. A manual sprayer was used to apply the suspension onto cucumber leaves and fruits until runoff point. Five seedlings and five fruits, which served as the control, were only sprayed with sterile distilled water. All the cucumber seedlings and fruits were placed in a moist chamber for seven days at 22 ± 2 °C and 100 % relative humidity. Once the inoculated seedlings and fruits presented the same symptoms as the initially-collected tissues, reisolates of the inoculated organism were

usando una cámara de Neubauer para el conteo de esporas. Se agregaron 2 ml del surfactante Tween 20® por litro de agua destilada estéril. La suspensión se aplicó con un aspersor manual sobre hojas y frutos de pepino, hasta punto de escurrimiento. Cinco plántulas y cinco frutos, que sirvieron como control, se asperjaron únicamente con agua destilada estéril. Todas las plántulas y frutos de pepino se colocaron en cámara húmeda durante siete días a  $22 \pm 2$  °C y con 100 % de humedad relativa. Una vez que las plántulas y frutos inoculados presentaron la misma sintomatología que los tejidos colectados inicialmente, se obtuvieron reaislados del organismo inoculado siguiendo la metodología mencionada anteriormente. La prueba de patogenicidad se realizó dos veces.

### Identificación morfológica

Las características de las colonias crecidas en PDA se registraron cada 48 h. Además, se realizaron preparaciones con glicerol a partir de las estructuras de reproducción asexual (conidióforos y conidios). Las preparaciones se analizaron en microscopia de luz a 400 X, en donde se registró el tamaño, septación, forma y color de 20 conidióforos y 100 conidios. La identificación a nivel de género se realizó comparando las estructuras morfológicas del hongo con las claves de Barnett y Hunter (2006), y para especie se utilizaron las descripciones especializadas de Ellis (1971) y Crous *et al.* (2009).

### Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

A partir de colonias fungosas crecidas en PDA, se extrajo el DNA genómico con el kit DNAeasy (Qiagen®), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. Una vez extraído el DNA, se verificó su calidad por electroforesis en gel de agarosa (Ultrapure, Invitrogen®) al 1.5 %. Mediante PCR, y se amplificaron las regiones ITS1 e ITS2 usando los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Para cada reacción de PCR se utilizó un volumen final de 25 µl de la mezcla compuesta por amortiguador de DNA polimerasa Taq (Buffer) 1X, MgCl<sub>2</sub> a 0.13 mM, dNTP's a 16 µM, marcador molecular a 20 pmoles, Taq-DNA polimerasa a 0.4 U. A la mezcla de reacción se le adicionaron 5 µl de DNA del hongo (80 ng/µl) y se colocó en un termociclador CT 2400 ICA (Perkin-Elmer®). El programa del termociclador presentó las siguientes características: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min; 30 ciclos a 95 °C por 1 min, alineación a 50 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 2 min, y extensión final a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se purificó con el Kit Wizard PCR Clean up System (Quiagen®). Los productos de PCR se secuenciaron en el laboratorio MacroGen en Corea. Las secuencias ITS obtenidas en este estudio se compararon con secuencias de organismos referencia con mayor similitud, por medio

obtenido siguiendo la metodología mencionada above. The pathogenicity test was performed twice.

### Morphological identification

The characteristics of the colonies grown on PDA were recorded every 48 h. In addition, preparations with glycerol were made from asexual reproductive structures (conidiophores and conidia). The preparations were analyzed by light microscopy at 400 X, allowing the size, septation, shape and color of 20 conidiophores and 100 conidia to be recorded. Genus-level identification was made by comparing the morphological structures of the fungus with the keys of Barnett and Hunter (2006), and for species the specialized descriptions of Ellis (1971) and Crous *et al.* (2009) were used.

### DNA extraction, amplification and sequencing

From fungal colonies grown on PDA, genomic DNA was extracted with the DNeasy kit (Qiagen™), according to the protocol recommended by the manufacturer. Once the DNA was extracted, its quality was checked by electrophoresis on 1.5 % agarose gel (Ultrapure, Invitrogen™). By PCR, the ITS1 and ITS2 regions were amplified using the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). For each PCR reaction, a final volume of 25 µl of the mixture composed of 1X Taq DNA polymerase buffer, 0.13 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 µM dNTPs, molecular marker (20 pmoles) and Taq-DNA polymerase (0.4 U) was used. Next, 5 µl of the fungal DNA (80 ng/µl) were added to the reaction mixture, which was then placed in a CT 2400 ICA thermocycler (Perkin-Elmer®). The thermocycler program showed the following characteristics: initial denaturation at 95 °C for 1 min, 30 cycles at 95 °C for 1 min, alignment at 50 °C for 30 s, extension at 72 °C for 2 min, and final extension at 72 °C for 10 min. The amplified fragment was purified with the Wizard PCR Clean-Up System (Quiagen®). The PCR products were sequenced at the MacroGen laboratory in South Korea. The ITS sequences obtained in this study were compared to those of very similar reference organisms, through a search in the National Center for Biotechnology Information's BLAST database.

### Control test

For the greenhouse experiment, Green Sun variety cucumber plants grown in pots were used. Four commercial fungicides (benomyl, iprodione, chlorothalonil and thia-bendazole, at a dose of 2 g·liter<sup>-1</sup>) and the biological control agent *Trichoderma harzianum* (at a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia·ml<sup>-1</sup>) were used, along with an inoculated control ( $1 \times 10^8$  conidia·ml<sup>-1</sup>), and one without inoculation, with 10 replications of each, under a randomized complete block experimental design, where the experimental unit was a

de una búsqueda en la base de datos BLAST del National Center for Biotechnology Information.

### Prueba de control

Para el experimento en invernadero, se utilizaron plantas de pepino variedad Sol verde cultivadas en macetas. Se evaluaron cuatro fungicidas comerciales (benomilo, iprodione, clorotalonil y thiabendazol, a una dosis de 2 g·litro<sup>-1</sup>), y el agente de control biológico *Trichoderma harzianum*, a una concentración de 1 × 10<sup>8</sup> conidios·ml<sup>-1</sup>), un testigo inoculado (1 × 10<sup>8</sup> conidios·ml<sup>-1</sup>), y otro sin inocular, con 10 repeticiones de cada uno, bajo un diseño experimental de bloques completos al azar, en donde la unidad experimental fue una maceta. La cepa de *T. harzianum* se obtuvo de la colección de cepas del Laboratorio de Micología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Los tratamientos se asperjaron sobre hojas, flores y frutos de pepino recién formados hasta el punto de escurrimiento. Dichas aplicaciones se realizaron durante la etapa de floración-fructificación con una mochila manual de 15 litros y boquilla de cono hueco. La suspensión conidios de *T. harzianum* se preparó a partir de colonias de 30 días de edad. Se ajustó la concentración a 1 × 10<sup>8</sup> conidios·ml<sup>-1</sup> con ayuda de la cámara de Neubauer. Veinticuatro horas después, se realizó la inoculación del patógeno sobre las plantas, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente en las pruebas de patogenicidad, y las plantas se mantuvieron en una cámara bioclimática a 24 °C y con humedad relativa de 100 % durante 48 h. Se evaluó el número de brotes, flores y frutos enfermos, con la escala de daño: 1= ausencia de enfermedad; 2= 25 % de enfermedad; 3= 50 % de enfermedad, 4= 75 % de enfermedad y 5= planta muerta. Además se determinaron el porcentaje de infección y porcentaje de efectividad.

### Análisis estadístico

Con los valores de la escala de daño se calculó la media ponderada de la severidad (Bautista y Díaz, 2001):

$$I = \frac{\sum_{i=1}^5 (n_i \times v_i)}{CM \times N} \times 100$$

Donde:

I = porcentaje de infección de plantas inoculadas

n<sub>i</sub> = número de plantas de la categoría i

v<sub>i</sub> = valor en la escala de daño de la categoría i

CM = categoría de mayor valor numérico de la escala de daño

N = número del total de plantas muestreadas

pot. The strain of *T. harzianum* was obtained from the strain collection housed at the Universidad Autónoma Chapingo's Mycology Laboratory. The treatments were sprayed onto newly-formed cucumber leaves, flowers and fruits until runoff point. These applications were made during the flowering-fruitletting stage using a 15-liter manual backpack and hollow cone nozzle. The conidial suspension of *T. harzianum* was prepared from 30-day-old colonies. The concentration was adjusted to 1 × 10<sup>8</sup> conidia·ml<sup>-1</sup> using the Neubauer chamber. Twenty-four hours later, the inoculation of the pathogen on the plants was carried out, following the procedure outlined above in the pathogenicity tests, and the plants were kept in a bioclimatic chamber at 24 °C and 100 % relative humidity for 48 h. The number of diseased buds, flowers and fruits were evaluated using the following damage scale: 1= no disease; 2= 25 % diseased; 3= 50 % diseased, 4= 75 % diseased and 5= dead plant. In addition, the infection percentage and efficacy percentage were determined.

### Statistical design

With the damage scale values, the weighted average severity was calculated (Bautista and Díaz, 2001):

$$I = \frac{\sum_{i=1}^5 (n_i \times v_i)}{HM \times N} \times 100$$

Where:

I = infection percentage of inoculated plants

n<sub>i</sub> = number of plants in category i

v<sub>i</sub> = damage scale value of category i

HC = highest numerical value category on the damage scale

N = total number of plants sampled

With the infection percentage value, Abbott's formula was calculated (Bautista and Díaz, 2001):

$$E = \frac{IT - it}{IT} \times 100$$

Where:

E = treatment efficacy percentage

IT = inoculated control infection percentage

it = treatment infection percentage

Con el valor del porcentaje de infección se calculó la fórmula de Abbott (Bautista y Díaz, 2001):

$$E = \frac{IT - it}{IT} \times 100$$

Donde:

E = porcentaje de efectividad del tratamiento

IT = porcentaje de infección del testigo inoculado

it = porcentaje de infección del tratamiento

Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), usando el paquete de análisis estadístico SAS 9.0 (Statistical Analysis System®).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Hongos aislados

De flores necróticas, se obtuvieron un total de 200 aislados, los cuales correspondieron a los hongos *Botrytis* sp. (88 %), *Alternaria* sp. (10 %) y *Aspergillus* sp. (2 %). A partir de hojas con síntomas de tizón, se aisló a *Botrytis* sp. (79 %) y *Alternaria* sp. (21 %). De frutos con pudrición se obtuvieron un total de 100 aislados fungosos, los cuales se identificaron como *Botrytis* sp. (74 %), *Aspergillus* sp. (15 %), *Fusarium* sp. (6 %) y *Cladosporium* sp. (5 %).

### Prueba de patogenicidad

Cinco días después de la inoculación (ddi) con la suspensión de conidios de *Botrytis* sp., todas las plántulas presentaron puntuaciones de color gris pardo a marrón oscuro en el tejido foliar. El hongo invadió el tejido y provocó lesiones necróticas (Figura 1A) que disminuyeron el área fotosintética (Figura 1B), lo que resultó en plántulas débiles y raquíticas (Figura 1C), y en los casos más severos causó la muerte de las plántulas al invadir el meristemo apical e inducir marchitez del tejido vegetal (Figura 1D). Por otra parte, todos los frutos inoculados con la suspensión conidial mostraron síntomas de pudrición gris oscura a los 6 ddi, además de una abundante esporulación del hongo. Las plántulas y frutos control permanecieron libres de la enfermedad. A partir de las plántulas y frutos sintomáticos, se re-aisló a *Botrytis* sp.

### Identificación morfológica

Las colonias de *Botrytis* sp. exhibieron crecimiento micelial concéntrico, de consistencia afelpada y color blanco (Figura 2A). Después de 15 días, el micelio se tornó color gris. Los aislados más viejos formaron una gran can-

Analysis of variance and Tukey's comparison of means test ( $P \leq 0.05$ ) were performed using SAS 9.0 (Statistical Analysis System®) statistical analysis software.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Isolated fungi

From necrotic flowers, a total of 200 isolates, corresponding to the fungi *Botrytis* sp. (88 %), *Alternaria* sp. (10 %) and *Aspergillus* sp. (2 %), were obtained. From leaves with blight symptoms, *Botrytis* sp. (79 %) and *Alternaria* sp. (21 %) were isolated. From fruits with rot, a total of 100 fungal isolates, which were identified as *Botrytis* sp. (74 %), *Aspergillus* sp. (15 %), *Fusarium* sp. (6 %) and *Cladosporium* sp. (5 %), were obtained.

### Pathogenicity test

Five days after inoculation (dai) with the conidial suspension of *Botrytis* sp., all seedlings had brownish-grey to dark brown spots in the leaf tissue. The fungus invaded the tissue and caused necrotic lesions (Figure 1A) that decreased the photosynthetic area (Figure 1B), which resulted in weak and stunted seedlings (Figure 1C), and in more severe cases killed the seedlings by invading the apical meristem and inducing wilting of the plant tissue (Figure 1D). On the other hand, all the fruits inoculated with the conidial suspension showed dark gray rot symptoms at 6 dai, plus abundant sporulation of the fungus. The control seedlings and fruits remained free of the disease. From the symptomatic seedlings and fruits, *Botrytis* sp. was re-isolated.

### Morphological identification

The colonies of *Botrytis* sp. exhibited white, felt-like, concentric mycelial growth (Figure 2A). After 15 days, the mycelium became gray. The older isolates formed a large amount of black, irregularly-shaped sclerotia with a diameter of 2-3 mm. In light microscopy, we observed long, irregularly-produced conidiophores that were septate, pigmented, with a smooth wall, apically branched and with clusters of conidia (Figure 2B). The conidia were unicellular, ovoid, smooth, pale brown and 8-15 x 6-9 µm. All the morphological characteristics observed matched the descriptions of Ellis (1971) and Crous *et al.* (2009) for the case of *Botrytis cinerea*.

### Molecular identification

The two ITS region sequences obtained showed 99 % similarity with the sequence of *Botryotinia fuckeliana* (Anamorph: *Botrytis cinerea*) with the Genbank access number EU128649. This confirmed the results obtained in the morphological identification.

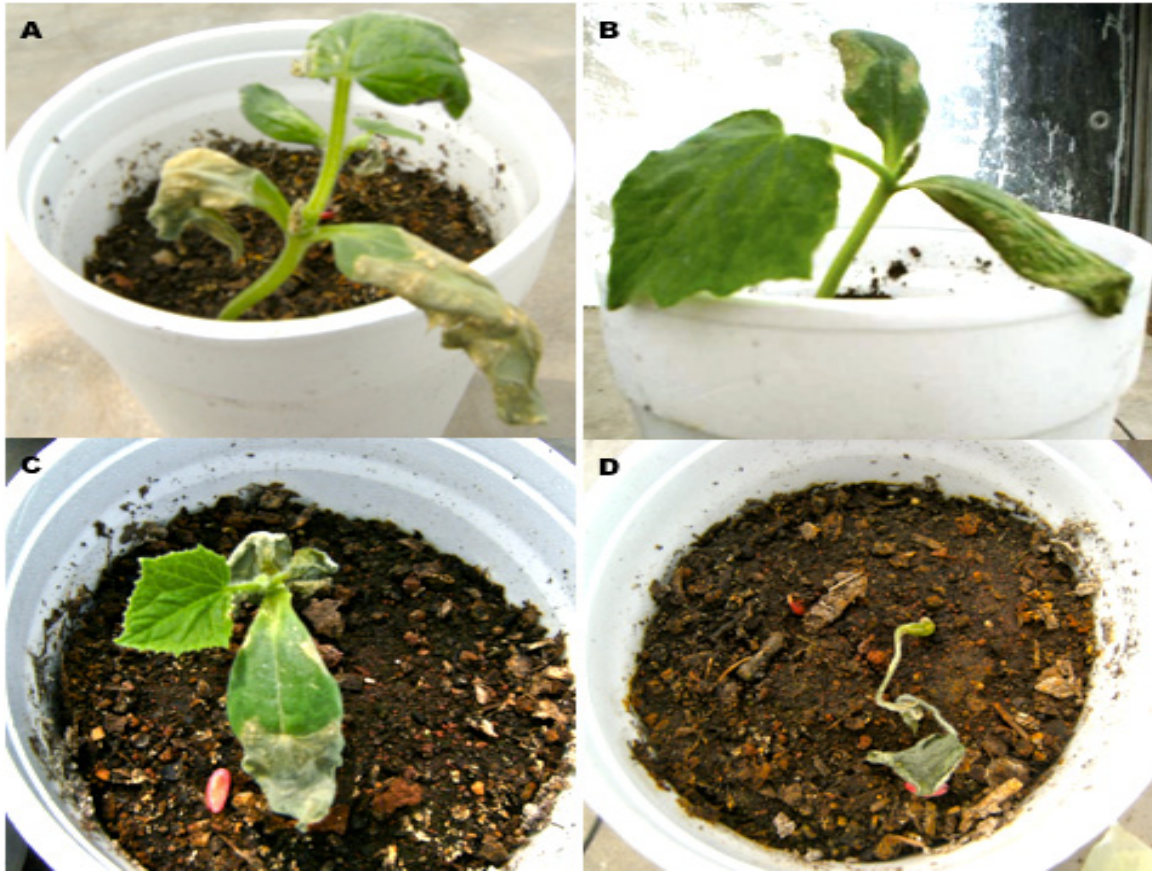


FIGURA 1. Sintomatología inducida por la inoculación de *Botrytis* sp. en plántulas de pepino. A) necrosis; B) reducción del área foliar; C) disminución de vigor; D) marchitez.

FIGURE 1. Symptoms induced by inoculation of cucumber seedlings with *Botrytis* sp. A) necrosis; B) reduction in leaf area; C) decline in vigor; D) wilting.

tividad de esclerocios negros de forma irregular, con un diámetro de 2-3 mm. En microscopía de luz, se observaron conidióforos largos originados irregularmente, septados, pigmentados, con pared lisa, ramificados apicalmente y con racimos de conidios (Figura 2B). Los conidios fueron unicelulares, ovoides, lisos, color café pálido y de 8-15 x 6-9  $\mu\text{m}$ . Todas las características morfológicas observadas correspondieron con las descripciones de Ellis (1971) y Crous *et al.* (2009) para el caso de *Botrytis cinerea*.

### Identificación molecular

Las dos secuencias de la región ITS obtenidas mostraron 99 % de similitud con la secuencia de *Botryotinia fuckeliana* (Anamorfo: *Botrytis cinerea*) con número de acceso en el Genbank EU128649. Lo anterior confirmó los resultados obtenidos en la identificación morfológica.

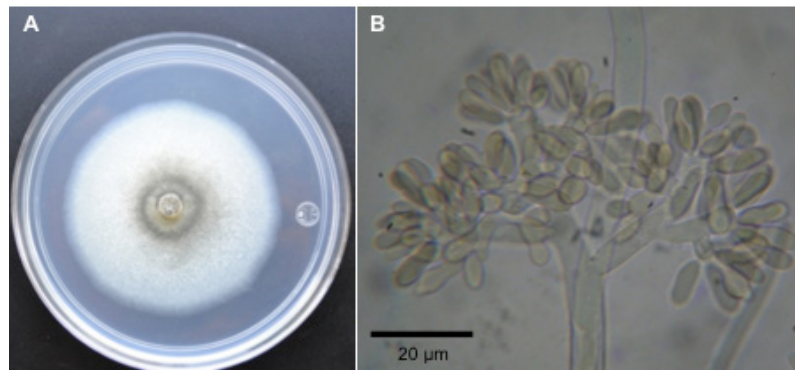
Los resultados de la identificación morfológica y molecular, así como a las pruebas de patogenicidad, determinaron que *B. cinerea* fue el agente causal de los síntomas de necrosis de flores, tizón de hojas y pudrición de frutos

The results of morphological and molecular identification, as well as pathogenicity tests, determined that *B. cinerea* was the causal agent of the symptoms of flower necrosis, leaf blight and fruit rot in cucumber collected in fields in Totolapan, Morelos, Mexico. All symptoms observed in diseased plants in this study matched those indicated by Dik and Elad (1999) and Segarra *et al.* (2007), who reported *B. cinerea* as the inducing agent of necrosis and gray mold on cucumber leaves, flowers, stems and fruits under both greenhouse and field conditions.

### Treatment efficacy

Based on the damage scale used, the infection percentages of the disease in inoculated plants and the efficacy percentage of the treatments were determined (Table 1).

The treatment of inoculated seedlings showed 64 % infection, whereas the treatments with the fungicides chlorothalonil, thiabendazole and benomyl had the highest efficacy. However, infection rates above 43 % were obtained with these treatments.



**FIGURA 2.** Caracteres de un aislado de *B. cinerea* obtenido a partir de flores de pepino con síntomas de necrosis. A) Colonia de 4 días de edad cultivada en medio de cultivo PDA; B) Ápice ramificado de un conidióforo con racimos de conidios.

**FIGURE 2.** Characters of an isolate of *B. cinerea* obtained from cucumber flowers with necrosis symptoms. A) 4-day-old colony cultured on PDA culture medium; (B) Branched apex of a conidiophore with clusters of conidia.

de pepino colectados en campos de Totolapan, Morelos, México. Todos los síntomas observados en las plantas enfermas de este estudio correspondieron con lo indicado por Dik y Elad (1999) y Segarra *et al.* (2007), quienes reportaron a *B. cinerea* como el agente inductor de necrosis y pudrición gris en hojas, flores, tallos y frutos de pepino, tanto en condiciones de invernadero como a campo abierto.

### Efectividad de tratamientos

Con base en la escala de daño utilizada, se determinaron los porcentajes de infección de la enfermedad en plantas inoculadas y el porcentaje de efectividad de los tratamientos (Cuadro 1). El tratamiento de plántulas inoculadas presentó 64 % de infección, mientras que los tratamientos a base de los fungicidas clorotalonil, thiabendazol y benomilo presentaron la mayor efectividad. Sin embargo, con estos tratamientos se obtuvieron infecciones superiores a 43 %.

El fungicida multi-sitio clorotalonil resultó ser el tratamiento más efectivo dentro de la gama de fungicidas evaluados, lo cual se debió a que es un compuesto altamente tóxico sobre conidios de *Botrytis* spp., tal y como lo reportaron Slawewski *et al.* (2002) y Tremblay *et al.* (2003).

Existen varios reportes en donde señalaron a los fungicidas benzimidazoles como altamente efectivos en el control de infecciones causadas por *B. cinerea* (Delp, 1995). Sin embargo, los resultados de este estudio mostraron que los fungicidas benomilo y thiabendazol exhibieron una efectividad similar a la del fungicida multi-sitio clorotalonil. Posiblemente, estos resultados son atribuidos al fenómeno de resistencia a fungicidas que presenta *B. cinerea*, principalmente con los grupos químicos que incluyen a los benzimidazoles (benomilo y thiabendazol), dicarboximidas (iprodione) y fenilcarbamatós (Elad *et al.*, 2008).

The multi-site fungicide chlorothalonil proved to be the most effective treatment among the fungicides evaluated, which was due to it being a highly toxic compound on conidia of *Botrytis* spp., as reported by Slawewski *et al.* (2002) and Tremblay *et al.* (2003).

There are several reports which point out that benzimidazole fungicides are highly effective in controlling infections caused by *B. cinerea* (Delp, 1995). However, the results of this study showed that the fungicides benomyl and thiabendazole exhibit similar efficacy to that of the multi-site fungicide chlorothalonil. These results may be attributable to the phenomenon of fungicide resistance presented by *B. cinerea*, primarily with the chemical groups that include the benzimidazoles (benomyl and thiabendazole), dicarboximides (iprodione) and phenylcarbamates (Elad *et al.*, 2008).

According to Marsh (1977), good fungicides are those with more than 90 per cent efficacy; the fungicides used in this study do not fall within this range, since they obtained less than 31 % efficacy. Another probable reason they did not obtain acceptable efficacy in the control of infections caused by *B. cinerea* is that in this study only one application of each fungicide was made, in contrast with different efficacy studies in which at least two applications of each systemic fungicide were performed, in addition to the spraying of multi-site fungicides at a frequency of up to four applications per cycle, as mentioned by Yildiz *et al.* (2007).

Although Dik and Elad (1999) and Lee *et al.* (2006) reported considerable progress in the biocontrol of *Botrytis* spp. using *Trichoderma* spp. under field conditions, the efficacy of biocontrol organisms is very inconsistent, mainly due to the highly complex nature of the interaction between plant, pathogen, environment and biocontrol agent (Elad and Steward, 2007). Other factors affecting the efficacy of *T. harzianum* are the limited temperature or humidity rang-

**CUADRO 1. Comparación de medias para infección de *Botrytis cinerea* y efectividad de tratamientos en plantas de pepino.****TABLE 1. Comparison of means for infection of *Botrytis cinerea* and treatment efficacy in cucumber plants.**

| Tratamiento /<br>Treatment            | Media de Infección (%) /<br>Mean (%) Infection | Media de Efectividad (%) /<br>Mean (%) Efficacy |
|---------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Benomilo/ Benomyl                     | 45.2c <sup>z</sup>                             | 28.50ab                                         |
| Iprodione/ Iprodione                  | 53.6b                                          | 15.74bc                                         |
| Clorotalonil/ Chlorothalonil          | 43.6c                                          | 30.72a                                          |
| Thiabendazol/ Thiabendazole           | 44.4c                                          | 29.63a                                          |
| <i>Trichoderma harzianum</i>          | 54.8b                                          | 14.59c                                          |
| Testigo inoculado/ Inoculated control | 64.4a                                          | ---                                             |

<sup>z</sup> = Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales (Tukey,  $P \leq 0.05$ )

<sup>z</sup> = Means with the same letter within columns are equal (Tukey,  $P \leq 0.05$ )

De acuerdo con Marsh (1977) se consideran buenos fungicidas aquellos que presentan efectividades superiores al 90 %, por lo que los fungicidas utilizados en este estudio no entran dentro de este rango, ya que obtuvieron efectividades menores al 31 %. Otra causa probable por la que no se obtuvieron efectividades aceptables en el control de infecciones causadas por *B. cinerea*, puede ser que en este estudio únicamente se realizó una aplicación de cada fungicida, en contraste con diferentes estudios de efectividad en los que realizaron al menos dos aplicaciones de cada fungicida sistémico, además de la aspersión de fungicidas multi-sitio en una frecuencia hasta de cuatro aplicaciones por ciclo, tal y como lo mencionaron Yildiz *et al.* (2007).

Aunque Dik y Elad (1999) y Lee *et al.* (2006) reportaron un progreso considerable en el biocontrol de *Botrytis* spp. mediante el uso de *Trichoderma* spp. bajo condiciones de campo. Existe una severa inconsistencia en la efectividad de los organismos de biocontrol, debido principalmente a la alta complejidad de las interacciones entre planta, patógeno, ambiente, y agente de biocontrol (Elad y Steward, 2007). Otras razones que condicionan la efectividad de *T. harzianum* se explican por los rangos restringidos de temperatura o humedad del agente de biocontrol para obtener un máximo de acción microbiana, además de que estos agentes son influenciados por fluctuaciones en poblaciones naturales de los microorganismos del filopiano que responden a cambios en los exudados de la planta y en el ambiente (Williamson *et al.*, 2007). Lo anterior puede explicar la baja efectividad que presentó en este estudio el tratamiento con *T. harzianum*.

En este estudio, la infección general por *B. cinerea* se incrementó progresivamente: el mayor valor se presentó a los 19 ddi con 60 % de daño en la planta y 22 % de efectividad, tal y como se observa en el Cuadro 2.

La interacción de los tratamientos y ddi para la variable infección mostró tres tipos de comportamiento: el primero para el testigo inoculado, con los porcentajes de infección más altos; el segundo para los tratamientos de *T.*

**CUADRO 2. Comparación de medias de días después de la inoculación (DDI) para infección por *B. cinerea* y efectividad de los tratamientos de control.****TABLE 2. Comparison of means of days after inoculation (DAI) for infection by *B. cinerea* and efficacy of the control treatments.**

| DDI /<br>DAI | Media de Infección (%) /<br>Mean (%) Infection | Media de Efectividad (%) /<br>Mean (%) Efficacy |
|--------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 5            | 44.7c <sup>z</sup>                             | 11.62b                                          |
| 8            | 48.0bc                                         | 26.47a                                          |
| 11           | 51.7b                                          | 23.09ab                                         |
| 14           | 50.7b                                          | 35.41a                                          |
| 19           | 60.0a                                          | 22.60ab                                         |

<sup>z</sup> = Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales (Tukey,  $P \leq 0.05$ ); DDI = días después de la inoculación.

<sup>z</sup> = Means with the same letter within columns are equal (Tukey,  $P \leq 0.05$ ); DAI = days after inoculation.

es of the biocontrol agent for maximum microbial action, and the fact that these agents are influenced by fluctuations in natural populations of phylloplane microorganisms that respond to changes in plant exudates and in the environment (Williamson *et al.*, 2007). This may explain the low efficacy presented in this study by the treatment with *T. harzianum*.

In this study, the overall infection by *B. cinerea* increased progressively: the highest value occurred at 19 dai with 60 % of the plant damaged and 22 % efficacy, as shown in Table 2.

Interaction of the treatments and dai for the variable infection showed three types of behavior: the first for the inoculated control, with the highest infection percentages; the second for the *T. harzianum* and iprodione treatments, and finally the fungicide group made up of chlorothalonil, benomyl and thiabendazole (Figure 3).

It should be noted that by applying the treatments preventively before inoculation, the lowest infection value occurred at 5 dai and the security interval remained until 8 dai.

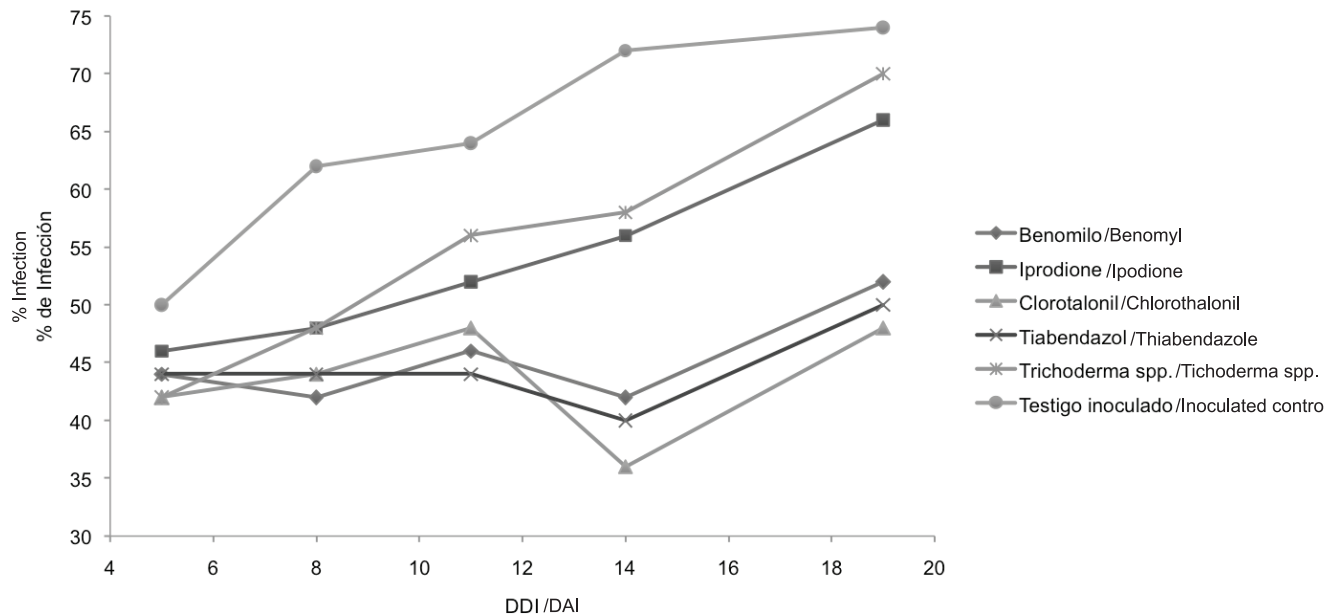


FIGURA 3. Interacción de tratamiento y días después de la infección (ddi) para la variable infección de *Botrytis cinerea* en plantas de pepino.

FIGURE 3. Interaction of treatment and days after infection (dai) for the variable infection of *Botrytis cinerea* in cucumber plants.

*harzianum* e iprodione, y por último el grupo de los fungicidas clorotalonil, benomilo, thiabendazol (Figura 3).

Cabe mencionar que al hacer la aplicación de los tratamientos preventivamente antes de la inoculación, el valor más bajo de infección se presentó a los 5 ddi y el intervalo de seguridad se mantuvo hasta los 8 ddi. Este periodo reducido de seguridad se atribuye a la agresividad con que *B. cinerea* infecta a las plantas de pepino. Estos resultados evidencian la necesidad de evaluar una mejor estrategia de manejo de este hongo fitopatógeno, ya que aun cuando se realizó la aplicación preventiva de los tratamientos, no se logró un control efectivo. Además, los principales fungicidas empleados para el control de *B. cinerea* presentan mediano y alto riesgo de inducir resistencia en el hongo. Por otro lado, *T. harzianum* no fue efectivo contra el hongo y requiere estudios posteriores. Se hace notoria la exploración de nuevas alternativas de manejo de *B. cinerea*, mismas que consideren alternar varios grupos químicos de fungicidas en conjunto con el control biológico y cultural.

### CONCLUSIONES

La identificación morfológica, molecular y pruebas de patogenicidad confirmaron que *Botrytis cinerea* es el agente causal de los síntomas de necrosis de flores, tizón de hojas y pudrición de frutos de pepino en Totolapan, Morelos, México.

Los fungicidas clorotalonil, thiabendazol y benomilo presentaron las más altas efectividades en el control de *B. cinerea* en plantas de pepino, con 30, 29 y 28 %,

This reduced security period is attributed to the aggressiveness with which *B. cinerea* infects cucumber plants. These results highlight the need for a better management strategy for this phytopathogenic fungus, since even though the treatments were applied preventively, effective control was not achieved. Furthermore, the main fungicides used to control *B. cinerea* have a medium to high risk of inducing resistance in the fungus. On the other hand, *T. harzianum* was not effective against the fungus and requires further study. It is apparent that the search for new management alternatives for *B. cinerea* should consider alternating various chemical groups of fungicides in conjunction with biological and cultural control.

### CONCLUSIONS

Morphological and molecular identification coupled with pathogenicity tests confirmed that *Botrytis cinerea* is the causal agent of symptoms of flower necrosis, leaf blight and fruit rot in cucumber in Totolapan, Morelos, Mexico.

The fungicides chlorothalonil, thiabendazole and benomyl had the highest efficacy in the control of *B. cinerea* in cucumber plants, with 30, 29 and 28 %, respectively, while the bio-control agent *T. harzianum* exhibited 14 % efficacy, which indicates that none of the treatments evaluated in this study showed acceptable efficacy in the control of the symptoms caused by *B. cinerea*.

*End of English Version*

respectivamente, mientras que el agente de biocontrol *T. harzianum* exhibió una efectividad del 14 %, lo que indica que ninguno de los tratamientos evaluados en este estudio mostraron una efectividad aceptable en el control de los síntomas causados por *B. cinerea*.

#### LITERATURA CITADA

- ANÓNIMO. 2012. Cierre de la producción agrícola por estado. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> (21 de Octubre de 2012).
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. Burgess publishing company. New York, USA. 241 p.
- BAUTISTA, M. N.; DÍAZ, G. O. 2001. Bases para realizar estudios de efectividad biológica de plaguicidas. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 148 p.
- BELANGER, R. R.; DUFOUR, N.; CARON, J.; BENHAMOU, N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology* 5(1): 41-54. doi: 10.1080/09583159550040006
- CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. 2009. Fungal Biodiversity. CBS-KNAW. Utrecht, The Netherlands. 269 p.
- DELP, C. J. 1995. Benzimidazole and related fungicides, pp. 291-303. In: Lyr, H. (ed.) *Modern Selective Fungicides*. Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany.
- DIK, A. J.; ELAD, Y. 1999. Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. *European Journal of Plant Pathology* 105(2): 123-137. doi: 10.1023/A:1008778213278
- DUBOS, B.; BULIT, J. 1981. Filamentous fungi as biocontrol agents on aerial plant surfaces, pp. 353-356 In: *Microbial Ecology of the Phylloplane*. J. P. Blackman (ed). Academic Press. London, United Kingdom.
- ELAD, Y.; ZIMAND, G.; ZAQS, Y.; ZURIEL, S.; CHET, I. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mold (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology* 42(3): 324-332. doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb01508.x
- ELAD, Y.; STEWART, A. 2007. Microbial control of *Botrytis* spp., pp. 223-241. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. (eds.). Springer. Dordrecht, The Netherlands. doi: 10.1007/978-1-4020-2626-3\_13
- ELAD, Y.; SHPIALTER, L.; KOROLEV, N.; MAMIEV, M.; RAV, D. D.; DORI I.; GANOT, I.; SHMUEL, D.; MATAN, E.; MESSIKA, Y. 2008. Integrated chemical and cultural control for grey mold (*Botrytis cinerea*) management in *Lisianthus*. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V*. 15th International Reinhardtbrunn Symposium. Friedrichroda, Germany. pp. 211-218. [http://dpg.phytomedizin.org/fileadmin/daten/04\\_Verlag/02\\_SP/05\\_Reinhardt/0294-sp-2008-Reinh-4.pdf](http://dpg.phytomedizin.org/fileadmin/daten/04_Verlag/02_SP/05_Reinhardt/0294-sp-2008-Reinh-4.pdf)
- ELLIS, M. B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, United Kingdom. 608 p.
- HOWELL, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1): 4-10. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.1.4
- KOIKE, S.T.; GLADDERS, P.; PAULUS, A. O. 2007. *Vegetable Diseases: a Color Handbook*. Third Edition. Academic Press. London, England. 448 p.
- LEE, S. K.; SHON, H. B.; KIM, G. G.; CHUNG, Y. R. 2006. Enhancement of biological control of *Botrytis cinerea* on cucumber by foliar sprays and bed potting mixes of *Trichoderma harzianum* YC459 and its application on tomato in the greenhouse. *Plant Pathology Journal* 22(3): 283-288. <http://ppj.dev.riceblast.snu.ac.kr:82/folder.php?a=down&id=43451>
- MARSH, R. W. 1977. *Systemic fungicides*. Second Edition. Longman Inc. New York, USA. 401 p.
- SEGARRA, G.; CASANOVA, E.; BORRERO, C.; AVILÉS, M.; TRILLAS, I. 2007. The suppressive effects of composts used as growth media against *Botrytis cinerea* in cucumber plants. *European Journal of Plant Pathology* 117(4): 393-402. doi: 10.1007/s10658-007-9108-x
- SLAWECKI, R. A.; RYAN, E. P.; YOUNG, D. H. 2002. Novel fungitoxic assays for inhibition of germination associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 597-601. doi: 10.1128/AEM.68.2.597-601.2002
- TREMBLAY, D. M.; TALBOT, B. G.; CARISSE, O. 2003. Sensitivity of *Botrytis squamosa* to different classes of fungicides. *Plant Disease* 87(5): 573-578. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.5.573
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In: *PCR protocols: A Guide to*

- Methods and Applications. Innis, M.; Gelfand, D.; Shinsky, J. J.; White, T. J. (eds). Academic Press. New York, United States of America. <http://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; VAN-KAN, J. A. L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8(5): 561–580. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x
- YILDIZ, F.; YILDIZ, M.; DELEN, N.; COSKUNTUNA, A.; KINAY, P.; TÜRKÜSAY, H. 2007. The effects of biological and chemical treatment on gray mold disease in tomatoes grown under greenhouse conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 31(5): 319-325. <http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-07-31-5/tar-31-5-6-0611-3.pdf>
- ZIMAND, G.; ELAD, Y.; CHET, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86(11): 1255-1260. [http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n11\\_1255.pdf](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n11_1255.pdf)