

Aislamiento de razas tolerantes de *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. a fungicidas sistémicos en la zona de Curicó¹

Iris Carreño I.² y Adriana Pinto de Torres²

INTRODUCCION

Durante los últimos cinco años se emplearon en forma intensiva, fungicidas sistémicos para controlar sarna o venturia causada por *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. en huertos de manzanos de la zona de Los Niches, Curicó, y en otras áreas frutícolas del país. En el primer tiempo se obtuvo un excelente resultado con estos productos para luego presentarse efectos contradictorios que llevaron a algunos agricultores a abandonar su uso.

En la última década, el uso de fungicidas sistémicos ha ido en aumento; sin embargo, poco después de iniciado su uso práctico se constataron casos de resistencia de hongos a estos productos. El desarrollo de la resistencia a los fungicidas tradicionales ha sido relativamente lento y hay pocos casos registrados.

En 1968, Benomyl [metil (butilcarbamoil) 2 benzimidazol carbamato] fue evaluado para el control de *V. inaequalis* en Australia del Sur y desde entonces ha sido aceptado como un excelente producto para el control de este hongo; sin embargo, en el año 1970-71 los agricultores notaron un control deficiente de la enfermedad, por lo que se sugirió un aumento de las dosis. En 1974, Wicks informó de la resistencia de *V. inaequalis* a Benomyl en Australia del Sur, resistencia que se desarrolló en tres años. Desde entonces se ha

informado de resistencia en varios países, incluyendo EE. UU. de Norteamérica (Jones y Walker, 1976) y en Nueva Zelandia (Tate y Samuels, 1976).

Si se presenta resistencia a un compuesto como Benomyl, podría existir resistencia cruzada con otros fungicidas del grupo de los benzimidazoles y, además, con el metil tiofanato que, al igual que Benomyl, son transformados en MBC (Metil benzimidazol 2 y 1 carbamato) que es el compuesto fungitóxico (Dekker, 1972).

También han informado la tolerancia de *V. inaequalis* al N acetato de dodecil guanidina (Dodine) Szkolnick y Gilpatrick (1973), en Nueva York, y Jones y Walker (1976), en Michigan, después de diez años de control altamente satisfactorio.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si las deficiencias en el control de la enfermedad se debían a la presencia de razas de *V. inaequalis* tolerantes a los productos sistémicos empleados. La investigación se realizó en la Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron muestras de frutos con lesiones de sarna provenientes de manzanos de la zona de Curicó que habían sido tratados con los fungicidas sistémicos Benlate (50% Benomyl) y Cercobin M [metil tiofanato] durante varias temporadas, y de manzanos de un huer-

¹Recepción originales: 4 de septiembre de 1978.

²Ings. Agrs. Fitopatólogos, Programa Frutales y Vitis, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

to casero que no habían sido tratados con fungicidas.

Se eligieron veinte lesiones nuevas de frutos de cuatro árboles tratados e igual número de lesiones de frutos de árboles no tratados con fungicidas. De cada lesión se sacaron esporas, las que se sembraron en dos placas con agar papa dextrosa (APD) conteniendo 5 ppm de Benomyl y dos placas de APD con 0 ppm de Benomyl. Estas placas fueron divididas en 4 partes iguales que se consideraron como repeticiones. Inmediatamente de sembradas las placas se revisaron al microscopio para comprobar que las esporas no estuvieran germinadas; luego se incubaron a 20-22°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se midió la germinación. Una vez hecho el recuento de esporas germinadas, se hicieron cultivos monospóricos, tomándose, como mínimo, cuatro esporas germinadas por lesión, las que se colocaron separadamente en una placa de agar papa con 5 ppm de Benomyl, agregado después de esterilizar el medio en autoclave, y dividida en cuatro partes con, por lo menos, una espora en cada cuadrante, para verificar si continuaban su desarrollo hasta formar una colonia o se estabilizaban al estado de espora germinada.

Posteriormente se seleccionaron los cultivos monospóricos de los aislamientos que crecieron y esporularon en las placas con 5 ppm de Benomyl provenientes de los árboles tratados con sistémicos y de los aislamientos que no crecieron en 5 ppm de Benomyl, provenientes de árboles no tratados con fungicidas. Estos aislamientos de árboles tratados y no tratados con fungicidas sistémicos, se sembraron en placas de APD que contenían las siguientes concentraciones de Benomyl y metil tiofanato: 0 - 5 - 100 - 250 y 500 ppm. Los fungicidas se agregaron al medio, después de la esterilización.

Pruebas de patogenicidad de razas tolerantes aisladas

Se usaron manzanas R. Delicious (4 repeticiones por raza tolerante), las que se colocaron en cámaras húmedas. Se rociaron con una suspensión de esporas dejando testigos y diariamente se les asperjó por igual con agua destilada esterilizada, manteniéndose en cámara húmeda durante 25 días. Posteriormente se hicieron las observaciones correspondientes en los frutos para determinar la presencia de lesiones de sarna.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las esporas que germinaron normalmente presentaron un tubo germinativo liso y sin enrollamiento y posteriormente dieron origen a colonias normales. Las esporas que germinaron anormalmente presentaron un tubo germinativo corto que se enrolló alrededor de la espora misma, o bien, su tubo germinativo mostró engrosamientos en diferentes lugares, preferentemente en el extremo. Estas últimas características son típicas de razas sensibles a un tóxico. Sin embargo, las esporas que germinaron normalmente en APD con Benomyl, no corresponden necesariamente a razas tolerantes o resistentes, ya que la germinación en un medio con fungicida no es un buen índice para demostrar tolerancia; la espora germinada debe ser capaz de producir micelio que luego esporule, para ser considerada resistente al fungicida.

Los porcentajes de germinación de los aislamientos provenientes de árboles tratados con sistémicos y de árboles nunca tratados con fungicidas se exponen en el Cuadro 1.

Cuadro 1 — Porcentaje de germinación de esporas de *V. inaequalis* en AP y APB aisladas de frutos de manzanos de árboles tratados con fungicidas sistémicos y nunca tratados con fungicidas.

Origen frutos	Esporas Germinadas %			
	Normales		Anormales	
	APB	AP	APB	AP
Arboles con fungicidas	12,6	12,9	0,3	0,1
Arboles sin fungicidas	22,1	50,6	2,3	0,0

APB = Agar papa 5 ppm Benomyl.
AP = Agar papa 0 ppm Benomyl.

Se observó un bajo porcentaje de germinación para todos los aislamientos provenientes de frutos de árboles que tuvieron tratamientos con fungicidas sistémicos. La diferencia de germinación en el medio con Benomyl en relación al medio sin el producto fue muy pequeña y a veces llegó a ser mayor en el medio con Benomyl.

Con los aislamientos provenientes de árbo-

les sin pulverizar, que presumiblemente serían sensibles al fungicida, ocurre lo contrario, ya que el porcentaje de germinación en el testigo fue mayor. La menor germinación en APD de los árboles con fungicidas comparada con la de los aislamientos de árboles sin fungicidas puede ser explicada debido a la existencia de una homeostasis genética. Al adquirir resistencia, la población habría perdido adaptabilidad. Esto concuerda con lo expresado por Dekker (1972) y otros autores citados por él. La pérdida de habilidad competitiva o adaptabilidad, explica que aunque existen razas muy resistentes coexisten razas con diferentes grados de sensibilidad al producto.

Los aislamientos seleccionados para comprobar su tolerancia al fungicida en diferentes dosis fueron ocho y provenían de árboles que habían sido tratados con fungicidas sistémicos. Sus respectivos porcentajes de germinación se exponen en el Cuadro 2. Los porcentajes de germinación de algunos aislamientos provenientes de árboles nunca tratados con fungicidas se exponen en el Cuadro 3.

Cuadro 2 — Porcentaje de germinación de esporas de 8 aislamientos de *V. inaequalis* usados en determinación de resistencia, provenientes de frutos de árboles tratados con fungicidas sistémicos.

Aislamiento	Dosis Benomyl			
	0 ppm		5 ppm	
	Germinación		Germinación	
	Normal	Anormal	Normal	Anormal
124	1,7	0,0	1,7	0,8
123	1,5	0,0	2,2	0,4
121	3,0	0,5	2,4	0,0
254	17,5	9,5	12,7	0,0
253	11,4	2,1	30,9	0,0
243	6,5	0,0	8,0	2,5
141	15,6	0,0	7,0	0,0
131	44,9	0,0	42,8	0,0

Todas las esporas de las razas anteriormente citadas que provenían de frutos de árboles tratados con Benlate, sometidas a cultivos monospóricos, fueron capaces de desarrollarse, formar colonias y esporular en placas que

Cuadro 3 — Porcentaje de germinación de esporas de algunos aislamientos de *V. inaequalis* provenientes de árboles nunca tratados con fungicidas.

Aislamiento	Dosis Benomyl			
	0 ppm		5 ppm	
	Germinación		Germinación	
	Normal	Anormal	Normal	Anormal
C I 1	74,1	0,0	0,0	5,6
C I 3	55,9	0,0	0,3	4,0
C II 2	68,9	0,0	0,0	4,4
C III 2	52,1	0,0	0,0	4,0
C IV 1	37,2	0,0	0,0	4,8
C V 1	53,8	0,0	0,0	14,9

contenían 5 ppm de Benomyl, demostrando su tolerancia al producto (Cuadro 2).

En el presente trabajo se consideró tolerante a una espora que se desarrolló normalmente en APD conteniendo 5 ppm de Benomyl, ya que aislamientos sensibles de *V. inaequalis* se inhiben a 0,5 ppm, o menos, de Benomyl. El crecimiento en 5 ppm representa un incremento de tolerancia de 10 veces.

El método empleado resulta efectivo para determinar razas de *V. inaequalis* tolerantes a fungicidas sistémicos, porque selecciona lesiones nuevas, libres de contaminantes, y esporas ya germinadas en el fruto, y luego, uniforma el material por medio del uso de cultivos monospóricos.

De los cultivos monospóricos realizados con las esporas provenientes de frutos de árboles nunca tratados con fungicidas, ninguna espora llegó a desarrollarse en el medio que contenía 5 ppm de Benomyl, demostrando, de esta manera, ser sensibles a este fungicida.

Los resultados de las pruebas a diferentes dosis de Benomyl y metil tiofanato a que fueron sometidos los aislamientos seleccionados como tolerantes y sensibles, se exponen en los Cuadros 4 y 5 (A y B).

Como se observa en el Cuadro 5 (B), el aislamiento CI 3 tuvo un comportamiento algo diferente a los otros aislamientos, a pesar de haber sido seleccionado como sensible. En APD con 5 ppm de Benomyl (Cuadro 3), tuvo un pequeño porcentaje de germinación normal (0,34%). Ninguno de los otros aislamientos sensibles, tuvo algún porcentaje de

Cuadro 4 — Desarrollo de micelio y esporulación de colonias de aislamientos tolerantes de *V. inaequalis* sometidos a diferentes concentraciones de Benomyl y Metil-tiofanato en agar papa dextrosa.

		ppm BENOMYL																								
		0					5					100					250					500				
Aisla- miento	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E		
121	8	8	0	8	8	8	0	8	8	8	0	7	4	0	3	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0	
123	8	8	0	8	8	8	0	8	8	8	0	8	8	0	8	0	8	0	0	0	8	0	0	8	0	
124	8	8	0	8	8	8	0	7	8	8	0	6	8	0	8	0	8	0	0	0	8	0	0	8	0	
141	8	8	0	8	8	8	0	8	8	8	0	4	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	8	0	
131	8	8	0	8	8	8	0	8	8	8	5	3	4	0	8	0	8	0	0	0	8	0	0	8	0	
243	8	8	0	8	8	8	0	8	8	8	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	8	0	
253	8	8	0	8	8	8	0	8	8	8	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	8	0	
254	8	8	0	8	8	8	0	8	8	8	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	8	0	
Total	64	64	0	64	64	64	0	63	64	64	28	11	29	60	0	27	7	60	0	0	12	0	0	0	0	

		ppm METIL TIOFANATO																								
		0					5					100					250					500				
Aisla- miento	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E		
121	3	3	0	3	3	3	0	3	3	3	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0	
123	4	4	0	4	4	4	0	3	3	3	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0	
124	4	3	0	3	3	3	0	3	3	3	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0	
141	8	7	0	5	8	7	0	5	4	4	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0	
131	4	3	0	3	3	3	0	3	3	3	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0	
243	4	4	0	4	4	4	0	3	3	3	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0	
253	4	3	0	3	3	3	0	2	2	2	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0	
254	4	3	0	3	3	3	0	2	2	2	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	4	0	
Total	35	30	0	28	30	27	0	24	28	28	0	0	32	0	0	0	32	0	0	0	32	0	0	0	0	

NCS = Número de colonias de *V. inaequalis*.
 MN = Crecimiento de micelio normal.
 MA = Crecimiento de micelio anormal.
 E = Formación de esporas.

Cuadro 5 — Desarrollo de micelio y esporulación de colonias de aislamientos sensibles de *V. inaequalis* sometidos a diferentes concentraciones de Benomyl y Metiltiofanato en agar papa dextrosa.

		ppm BENOMYL																			
		0				5				100				250				500			
Aislamiento	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	
																					100
CI V 1	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI II 2	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI I 3	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI III 2	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI V 1	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI I 1	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
Total	24	24	0	24	24	0	0	0	24	0	0	0	24	0	0	0	24	0	0	0	0

		ppm METILTIOFANATO																			
		0				5				100				250				500			
Aislamiento	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	NCS	MN	MA	E	
																					100
CI V 1	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI II 2	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI I 3	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI III 2	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI V 1	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
CI I 1	4	4	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
Total	24	24	0	24	24	0	0	0	24	0	0	0	24	0	0	0	24	0	0	0	0

A

B

NCS = Números de colonias de Venturia sembradas.
 MN = Crecimiento de micelio normal.
 MA = Crecimiento de micelio anormal.
 E = Formación de esporas.

germinación normal, en ese medio. Esto es, probablemente, un índice de una cierta resistencia al producto que se manifiesta en un crecimiento anormal del micelio y la formación de esporas a 5 ppm de Cercobin.

Esta cierta tolerancia al producto, puede deberse a que siempre en una población se están produciendo mutaciones al azar y dependerá de la selección del medio ambiente que estas razas se desarrollen o desaparezcan. En los huertos donde se aplican productos, éstos estarían ejerciendo una presión de selección, lo que les permitiría a estas razas establecerse. Este aislamiento proviene de un huerto casero no tratado, pero adyacente a un huerto comercial pulverizado con Cercobin, del cual podría provenir.

En las pruebas de patogenicidad, efectuadas en fruta, las razas tolerantes a Benomyl

sólo produjeron lesiones muy pequeñas, de color negro, ubicadas principalmente en las lenticelas. En el testigo sin venturia, pero sometido a un rocío diario y en cámara húmeda, no se desarrollaron estas lesiones.

CONCLUSIONES

Se determinó que algunos aislamientos de *V. inaequalis* provenientes de un huerto de la región de Los Niches, Curicó, Chile, tratado normalmente con fungicidas, fueron capaces de crecer y esporular en un medio hasta con 250 ppm de Benomyl y 5 ppm de metil tiofanato.

Por esta razón se concluye que ellos corresponden a razas tolerantes a los fungicidas sistémicos Benomyl y metil tiofanato.

R E S U M E N

Se determinaron razas tolerantes de *V. inaequalis* de un huerto de manzanos de la zona de Los Niches, Curicó, Chile, en el que las aplicaciones de Benlate y Cercobin habían fallado en el control de la enfermedad.

Se aislaron esporas no germinadas, libres de contaminación, a partir de lesiones nuevas de frutos de manzanos, las que se incubaron a 20-22°C en APD con 5 ppm de Benomyl durante 24 horas; se hizo recuento de esporas germinadas, y a partir de ellas se efectuaron cultivos monosporicos en placas que contenían 5 ppm de Benomyl.

Posteriormente estos aislamientos se sembraron en placas APD que contenían Benomyl y metil tiofanato en concentraciones de 0 - 5 - 100 - 250 y 500 ppm, en donde los aislamientos procedentes de árboles tratados con fungicidas, desarrollaron típicas colonias que llegaron a esporular en hasta 250 ppm de Benomyl y 5 ppm de metil tiofanato, demostrando su tolerancia a estos productos. Aislamientos de árboles que no habían sido tratados anteriormente con fungicidas no crecieron a concentraciones mínimas de estos productos.

S U M M A R Y

ISOLATION OF *Venturia inaequalis*, (CKE.) WINT. STRAINS TOLERANT TO SYSTEMIC FUNGICIDE FROM CURICO, CHILE

Isolates of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. from an apple orchard (Curicó, Chile) in which Benlate and Cercobin had given poor scab control were determined tolerant in culture to these fungicides. New lesions, free of contamination and germinated spores were chosen and also monosporic cultures were utilized.

Spores of *V. inaequalis* from new lesions on fruits were incubated at 20-22°C in PDA medium with 5 ppm Benomyl for 24 hrs; germinated spores were transferred to another PDA medium containing 5 ppm Benomyl.

These isolates were transferred to PDA medium containing 0 - 5 - 100 - 250 and 500 ppm Benomyl and Methyl tiophanate. The isolates from sprayed orchards developed and sporulated in 250 ppm Benomyl and 5 ppm Methyl tiophanate forming typical colonies, demonstrating 10 fold tolerance over susceptible strains isolated from fruits obtained from never sprayed trees.

LITERATURA CITADA

- DEKKER, J. 1972. Resistance. In Systemic Fungicide. R. W. March (Ed) Longmans, London. pp. 156-171.
- JONES, A. L. and WALKER, R. J. 1976. Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine and benzimidazole fungicides in Michigan. Plant Dis. Repr. 60: 40-44.
- TATE, K. G. and SAMUELS, G. J. 1976. Benzimidazole tolerance in *Venturia inaequalis* in New Zealand. Plant. Dis. Repr. 60: 706-710.
- SZKOLNICK, M. and GILPATRICK, J. D. 1973. Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine in relation to the history of dodine usage in apple orchard. Plant Dis. Repr. 57: 810-821.
- WICKS, T. 1974. Tolerance of the apple scab fungus to benzimidazole fungicides. Plant. Dis. Repr. 58: 886-889.