

# RESISTENCIA CRUZADA NEGATIVA ENTRE LOS FUNGICIDAS BENOMILO Y DIETHOFENCARB EN AISLAMIENTOS DE *Botrytis cinerea* DE VIDES<sup>1</sup>

## Negatively correlated cross-resistance to diethofencarb fungicide in benomyl-resistant *Botrytis cinerea* of grapes

Mario Alvarez A.<sup>2</sup>

### SUMMARY

Benzimidazole-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from grapes showed an increased sensitivity to diethofencarb on nutrient media as compared with the wild-type sensitive isolates. Diethofencarb was highly effective to inhibit the benzimidazole resistant strains but almost non-fungitoxic to the sensitive strains, showing a negatively correlated cross-resistance to benomyl. The ED50 values of diethofencarb in inhibiting radial mycelial growth of resistant and sensitive strains were 0.05 and 416.87 ppm, respectively, while the ED50 values of benomyl against these strains were 732.80 ppm and 0.11 ppm, respectively, and the ED50 values of the mixture diethofencarb + carbendazim were 0.07 ppm and 0.10 ppm, respectively.

Benzimidazole-resistant and -sensitive isolates were inoculated on bean plants, previously sprayed with fungicides. Resistant isolates caused complete infection on benomyl-treated leaves, but no infection occurred on diethofencarb- or iprodione-treated leaves. Sensitive isolates caused no infection on benomyl- or iprodione- treated leaves, but fully infected leaves sprayed with diethofencarb. Treatment with the commercial mixture of diethofencarb plus carbendazim controlled infection when inoculation was carried out with either resistant or sensitive isolates.

**Key words:** fungicides, resistance, gray mould.

### INTRODUCCION

En los últimos años, la podredumbre gris del racimo, provocada por el hongo *Botrytis cinerea* Pers., se ha constituido en un serio problema en la producción de uva de mesa en Chile. Si no se combate eficientemente, el patógeno puede provocar serias pérdidas tanto en pre como en postcosecha. La enfermedad se ha controlado por años en el país mediante fungicidas aplicados varias veces en primavera-verano, pertenecientes principalmente a los grupos químicos de las dicarboximidazoles y los benzimidazoles.

Desde la introducción de productos sistémicos en el mercado mundial de fungicidas, el fenómeno de la resistencia a estos compuestos ha provocado un serio problema en el control de muchas enfermedades de las plantas cultivadas. La resistencia se define como aquel cambio heredable y estable de un hongo a la acción de un fungicida que se traduce en una mayor sensibilidad al compuesto químico (Delp y Dekker, 1985).

En 1979 (Ossandón, 1981; Alvarez y Rebufel, 1982) se detectaron en Chile razas resistentes al grupo benzimidazólico, situación que se ha mantenido con el tiempo. Este mismo fenómeno, traducido en una ineficiencia de control del hongo ante la aplicación de fungicidas, se ha presentado en otros lugares del mundo, especialmente Europa (Leroux y otros, 1985).

Una de las formas de lucha contra la presencia de razas resistentes es el empleo de fungicidas hacia los cuales ellas presentan resistencia cruzada negativa (Kato y otros 1984; Nakamura y otros, 1986). Resistencia cruzada negativa (RCN) es aquel fenómeno en que el gen de un hongo confiere resistencia a un determinado fungicida y a su vez extrema sensibilidad a otro (Leroux y otros, 1985).

La RCN en hongos fitopatógenos fue establecida entre fungicidas con modo de acción similar en *Aspergillus nidulans* por van Tuyl, Davidse y Dekker (1974) y por Waard y van Nistelrooy (1983) en *Penicillium italicum* para fungicidas con diferente modo de acción y por Shaby, Koenraadt y Dekker (1987) entre benomilo y dos fenilcarbamatatos en aislamientos de *Venturia inaequalis* y *V. pirina*.

<sup>1</sup>Recepción de originales: 8 de junio de 1990.

<sup>2</sup>Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

En *B. cinerea*, el fenómeno ha sido descrito en varios trabajos. Kato y otros (1984) lo establecieron entre los grupos benzimidazólicos y los fenilcarbamatos. En Gran Bretaña, aislamientos resistentes a benzimidazoles presentaron gran sensibilidad a metil N-(3,5 diclorofenil)-carbamato (Nathaniels, Wilson y Fletcher, 1985).

En Francia, cepas de *B. cinerea*, aisladas de vides, con resistencia a benzimidazoles, presentaron aguda sensibilidad al isopropil 3,4-dietoxifenil carbamato (S-32165, dietofencarb) (Leroux y otros, 1985). Nakamura y otros (1986) también demostraron RCN entre estos grupos químicos, estableciendo gran selectividad de dietofencarb hacia aislamientos resistentes a benzimidazoles.

El objetivo del presente trabajo fue establecer la sensibilidad a dietofencarb *in vitro* e *in vivo*, de aislamientos de *B. cinerea* de vides en Chile que poseían resistencia a benomilo y determinar la existencia de RCN entre ambos fungicidas.

## MATERIALES Y METODOS

### Acción de fungicidas *in vitro*

El medio utilizado fue agar-papa-dextrosa (APD) esterilizado al autoclave, el cual se agregó con cantidades proporcionales de los fungicidas utilizados a discos Petri de 90 mm de diámetro. Los fungicidas se agregaron al medio contenido en matraces después de la esterilización, mantenidos a 40-50°C, regulado en baño de temperatura constante. A cada matraz se agregó el fungicida suspendido en agua estéril y agitado en forma rotatoria para homogenizar la suspensión antes de vaciar el medio a los discos.

Se utilizaron los fungicidas benomilo (Benlate 50PM, DuPont de Nemours) y dietofencarb (S-32165 25PM, Sumitomo Chemical Co. Ltd.), los que fueron probados en respectivas concentraciones expresadas en ingrediente activo de : 0,001; 0,05; 0,1; 10; 100; 500 y 1.000 ppm.

Ambos productos se emplearon utilizando dos cepas de *B. cinerea*, una sensible y otra resistente a fungicidas benzimidazólicos (benomilo, carbendazima, metiltiofanato), aisladas de vides y mantenidas en el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental La Platina perteneciente al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Las cepas se traspasaron desde tubos de ensayo a discos Petri con APD sin fungicida, incubándose en estufa de cultivo por 24 a 48 horas. Desde los márgenes de colonias no esporuladas, se sacó mediante un sacabocados de 6 mm de diámetro, un cilindro de agar con micelio, el que se colocó al

centro de cada disco que contenía APD + fungicida. Cada dosis/fungicida se repitió en tres discos, incluyéndose otros tres con agar sin fungicida que fueron utilizados como testigos.

Los discos inoculados se incubaron por 48 horas, efectuándose luego una medición del crecimiento de la colonia, al cual se le restó 6 mm, equivalente al diámetro del cilindro de agar. Para cada fungicida, dosis y raza se estableció el porcentaje de inhibición referido al diámetro de crecimiento de la colonia del tratamiento en relación a su respectivo testigo sin fungicida.

### Acción de fungicidas *in vivo*

Se utilizaron hojas cotiledónicas amputadas de fréjol cv. Great Northern, obtenidas de plantas que se hicieron germinar y desarrollar en invernadero hasta el estado de hojas primarias.

Previo a la amputación las hojas fueron pulverizadas con suspensiones de los siguientes fungicidas: dietofencarb (25 ppm i.a.), benomilo (25 ppm i.a.), iprodione (10 ppm i.a.) o dietofencarb + carbendazima (25 + 25 ppm i.a.). Como testigo se utilizaron hojas pulverizadas con agua destilada.

Una vez secas las hojas a temperatura ambiente, se colocaron sobre rejillas dentro de bandejas de plástico, con papel filtro mojado en la base, para producir cámara húmeda y fueron inoculadas individualmente con 15 cepas de *B. cinerea* de vides. De éstas, 12 correspondían a razas aisladas de campo resistentes a benzimidazoles, 2 a sensibles y una resistente obtenida en laboratorio. La inoculación se realizó colocando sobre el haz de las hojas un cilindro de agar con micelio del hongo de 48 horas de edad, que se mantenía en discos Petri con APD sin fungicidas. Las cajas se cubrieron con tapas que cerraron herméticamente y se dejaron en condiciones de laboratorio. La evaluación se efectuó al quinto día, estableciéndose tres categorías de crecimiento del hongo en las hojas: desarrollo abundante, desarrollo escaso y sin desarrollo.

### Dosis media efectiva (ED 50) de los fungicidas

Se utilizó una raza resistente y otra sensible a benzimidazoles de *B. cinerea* aisladas de vides, las que fueron sometidas a distintas concentraciones de fungicidas en APD siguiendo la metodología descrita. Los fungicidas utilizados fueron dietofencarb, benomilo y dietofencarb + carbendazima, en respectivas concentraciones en i.a. de 0,01; 0,0316; 0,1; 3,16; 10; 100; 316 y 1.000 ppm. Se usaron tres repeticiones por raza y concentración de los fungicidas. Como testigo se usaron discos con APD sin fungicidas que se utilizaron como base de crecimiento para establecer el porcentaje de inhibición de los tratamientos.

Los valores ED 50 se calcularon por análisis de regresión entre el logaritmo de la concentración y el porcentaje de inhibición transformado a unidades Probit.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El porcentaje de inhibición de las siete concentraciones utilizadas en el ensayo *in vitro* de los fungicidas benomilo y dietofencarb, obtenido para razas sensible y resistente se señala en el Cuadro 1. La raza sensible se inhibió 8,6% con 0,001 ppm de benomilo y 100% a partir de la dosis de 0,1 ppm, en tanto que dietofencarb la inhibió 13,3% a 0,001 ppm y sólo 91,4% a 1.000 ppm. La raza resistente se inhibió 14,8 y 85,4% con 0,001 y 1.000 ppm de benomilo, respectivamente y 12,5% a 0,001 ppm dietofencarb, el cual la inhibió 100% a partir de la dosis 100 ppm.

**CUADRO 1. Porcentaje de inhibición *in vitro* de una raza sensible y otra resistente a benzimidazoles de *B. cinerea* en siete concentraciones de benomilo y dietofencarb**

**TABLE 1. Inhibition (%) of mycelial growth of benzimidazole-sensitive or benzimidazole-resistant isolates of *B. cinerea* on benomyl- or dietofencarb-amended media**

PPM	Benomilo		Dietofencarb	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
1.000	100,0	85,4	91,4	100,0
500	100,0	68,8	75,2	100,0
100	100,0	45,8	26,7	100,0
10	100,0	45,8	14,3	64,4
0,1	100,0	31,2	20,9	66,7
0,05	44,8	22,9	9,5	48,1
0,001	8,6	14,8	13,3	12,5

Los resultados señalados indican la existencia de RCN entre los fungicidas benomilo y dietofencarb. El gen que confiere resistencia en *B. cinerea* a benomilo, establecido por el hecho que el hongo no se inactiva *in vitro* aún a dosis tan altas como 1.000 ppm, le confiere a su vez extrema sensibilidad a dietofencarb, ya que es inhibida a dosis tan bajas como 0,001 ppm de este producto. Por otra parte, la raza sensible no inhibió completamente su desarrollo aún a dosis de 1.000 ppm de dietofencarb, en tanto que mostró inhibición total con benomilo a 0,1 ppm. Resultados similares fueron encontrados por Kato y otros (1984) utilizando cepas de *B. cinerea* aisladas de varias plantas cultivadas y por Elad, Shabi y Katan (1988) aisladas de vides.

El resultado de la inoculación de *B. cinerea* en hojas de fréjol amputadas, inoculadas con razas sensibles y resistentes a benzimidazoles que habían sido previa-

mente tratadas con fungicidas, se señala en el Cuadro 2. Se determinó que ambas razas sensibles sólo se desarrollaron en las hojas testigo sin fungicida y en las tratadas con dietofencarb. Las razas resistentes se desarrollaron abundantemente en las hojas tratadas con benomilo y en el testigo. Ninguna raza se desarrolló en hojas tratadas con iprodione o dietofencarb + carbendazima. Los resultados expuestos confirman la RCN establecida en los experimentos *in vitro*. La raza resistente de laboratorio se desarrolló abundantemente en las hojas no tratadas con fungicidas y presentó un escaso desarrollo tanto en las tratadas con benomilo como dietofencarb. Este hecho sugiere que el nivel de resistencia o sensibilidad está condicionado por el nivel de resistencia o sensibilidad al otro.

La raza de laboratorio presenta un bajo nivel de resistencia a benomilo en contraste con el alto nivel mostrado por aquellas aisladas del campo. Dietofencarb es al igual que los benzimidazoles, un antimicótico que posee una gran acción inhibitoria sobre la elongación de las hifas miceliales (Kato y otros, 1984). Nakamura y otros (1986) sugieren que al igual que los benzimidazoles, dietofencarb afecta las funciones de la tubulina de las razas resistentes. Asimismo, Shabi y otros (1987) sugieren que la sensibilidad de los hongos a benomilo está gobernada por la afinidad del huso celular a carbendazima, el principio activo de benomilo. Por consiguiente, cualquier cambio en la tubulina que reduzca la afinidad hacia carbendazima, podría aumentar la afinidad a dietofencarb.

En el Cuadro 3 se señala los valores ED50 obtenidos por análisis de regresión entre el porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio de *B. cinerea* transformado a unidades de Probit (Y) para las razas sensibles y resistentes y el logaritmo de la dosis de los fungicidas (X) dietofencarb, benomilo y dietofencarb + carbendazima. Los resultados señalan que dietofencarb fue muy eficiente en inhibir el crecimiento de la raza resistente (ED 50 = 0,05 ppm), pero no la sensible (ED 50 = 416,87 ppm); por el contrario, el benzimidazol benomilo inhibió eficientemente la raza sensible (ED 50 = 0,11 ppm), pero no a la resistente (ED 50 = 732,00 ppm).

La mezcla de dietofencarb y el benzimidazol carbendazima inhibió eficientemente tanto a la raza resistente (ED 50 = 0,07 ppm) como a la sensible (ED 50 = 0,10 ppm). Los resultados del presente trabajo demuestran clara evidencia de RCN entre benomilo y dietofencarb en aislamientos de vides de *B. cinerea*, en Chile, al igual que lo encontrado en otras partes como Francia (Leroux y Gredt, 1985) o Israel (Elad y otros, 1988).

Estas variantes resistentes del hongo están presentes en toda el área productora de uva de mesa del país (Alvarez y Rebufel, 1982; Alvarez, 1989). Como una

**CUADRO 2. Desarrollo de *B. cinerea* sobre hojas de frejol inoculadas con razas sensibles o resistentes del hongo a compuestos benzimidazólicos, previamente tratados con dietofencarb, benomilo, iprodione o la mezcla dietofencarb + carbendazima**

**TABLE 2. Growth of *B. cinerea* on bean leaves inoculated with sensitive- or benzimidazole-resistant strains to benzimidazoles. The leaves were previously treated with diethofencarb, benomyl, iprodione or the mixture diethofencarb + carbendazim**

Raza <sup>1</sup>	Fungicidas <sup>2</sup>				Testigo
	Dietofencarb	Benomilo	Iprodione	Diet. + Carb.	
R1	- <sup>3</sup>	+	-	-	+
R2	-	+	-	-	+
R3	-	+	-	-	+
R4	-	+	-	-	+
R5	-	+	-	-	+
R6	-	+	-	-	+
R7	-	+	-	-	+
R8	-	+	-	-	+
R9	-	+	-	-	+
R10	-	+	-	-	+
R11	-	+	-	-	+
R12	-	+	-	-	+
S1	+	-	-	-	+
S2	+	-	-	-	+
RL	+/-	+/-	-	-	+

<sup>1</sup>R = resistente a benzimidazoles; S = sensible a benzimidazoles; RL = resistente, obtenida en laboratorio.

<sup>2</sup>Concentración de dietofencarb, dietofencarb + carbendazima y benomilo, 25 ppm de l.a.; concentración de iprodione, 10 ppm de l.a.

<sup>3</sup>Según crecimiento de *B. cinerea* sobre las hojas de fréjol: + = abundante; - = sin desarrollo; +/- = escaso.

**CUADRO 3. Valores ED 50 (ppm) obtenidos por regresión lineal simple, entre dosis de los fungicidas dietofencarb, benomilo y dietofencarb + carbendazima y la inhibición del micelio de una raza de *B. cinerea* sensible y otra resistente a benzimidazoles**

**TABLE 3. ED 50 (ppm) values obtained by simple linear regression analysis between the dosis of the fungicides diethofencarb, benomyl and diethofencarb + carbendazim and the percentage of inhibition of *B. cinerea* benzimidazole-sensitive or benzimidazole-resistant strains**

Fungicida	Raza	Ecuación <sup>1</sup>	ED 50
Dietofencarb	resistente	Y = 9,827 + 3,607 (log X)	0,05
	sensible	Y = 1,044 + 1,512 (log X)	416,87
Benomilo	resistente	Y = 0,181 + 1,682 (log X)	732,80
	sensible	Y = 7,711 + 2,802 (log X)	0,11
Dietofencarb + Carbendazima	resistente	Y = 9,448 + 3,883 (log X)	0,07
	sensible	Y = 8,026 + 3,028 (log X)	0,10

<sup>1</sup>Y = Porcentaje de inhibición de crecimiento de micelio transformado a unidades Probits; X = logaritmo de la dosis (ppm) de fungicidas.

forma de evitar o retrasar el desarrollo de la resistencia, se recomienda algunas medidas como el empleo alterado o mezclas de fungicidas de diferente modo de acción. Esta estrategia es difícil de aplicar debido a las pocas alternativas que presenta el reducido número de grupos químicos que comprenden los "botriticidas" en uso. El empleo de la RCN, incorporando a dietofencarb en el control químico de *B. cinerea* proporcionaría una nueva posibilidad de lucha contra las variantes resistentes condicionado a que todas ellas sean sensibles a dietofencarb. El uso del fungicida S-32165, formulado como 25% PM de carbendazima y 25% PM de dietofencarb en condiciones de campo debería cumplir los

objetivos de controlar *B. cinerea*, cualquiera que sea la composición de su población en razas resistentes o sensibles a benzimidazoles. Asimismo, su empleo debería prevenir la formación de razas resistentes en aquellas poblaciones compuestas principalmente por razas sensibles.

Sin embargo, los programas de control utilizando el fenómeno de la RCN deberán planearse cuidadosamente para evitar a su vez formación de razas resistentes a benzimidazoles y que no muestren sensibilidad a distofencarb. Este fenómeno ya ha sido informado por Faretra, Pollastro y di Tonno (1989) en Italia.

## RESUMEN

Razas de *Botrytis cinerea* de vides, resistentes a benzimidazoles, se comportaron sensibles al fungicida distofencarb (S-32165), en tanto que las razas sensibles a benzimidazoles fueron insensibles a dietofencarb. Los resultados señalaron resistencia cruzada negativa entre los fungicidas benomilo y distofencarb.

En pruebas *in vitro* con una raza sensible y otra resistente a benzimidazoles utilizando 7 concentraciones iguales en ingrediente activo de Benlate 50PM y S-32165 25PM incorporados al medio, la sensible se inhibió completamente con 0,1 ppm de benomilo en tanto que dietofencarb la inhibió sólo 91,4% a 1.000 ppm. La raza resistente se inhibió sólo 85,4% con 1.000 ppm de benomilo y completamente con 100 ppm de distofencarb.

En ensayos de inoculación con *B. cinerea* sobre fréjoles previamente pulverizados con benomilo, iprodione, dietofencarb o dietofencarb + carbendazima

utilizando razas resistentes y sensibles, se demostró que éstas no se desarrollaban en hojas tratadas con benomilo, iprodione o dietofencarb + carbendazima, pero sí en las tratadas sólo con dietofencarb. Las resistentes fueron controladas con iprodione, dietofencarb y la mezcla dietofencarb + carbendazima, pero no con benomilo.

La dosis media efectiva (ED 50) establecida en pruebas *in vitro* con una raza sensible y otra resistente y empleando ocho respectivas dosis de los fungicidas o la mezcla fue la siguiente: dietofencarb, 0,05 ppm con la raza resistente y 416,87 con la sensible; benomilo, 732,80 ppm con la resistente y 0,11 con la sensible; y la mezcla dietofencarb + carbendazima, 0,07 ppm con la sensible y 0,10 con la resistente.

**Palabras claves:** fungicidas, resistencia, pudrición gris.

## LITERATURA CITADA

- ALVAREZ A., MARIO. 1989. Resistencia a los fungicidas, fundamentos y aspectos prácticos. En: B. Latorre (ed.), Fungicidas y Nematicidas, avances y aplicabilidad. Colección en Agricultura. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile. p.: 125-134.
- ALVAREZ A., MARIO y REBUFEL A., MARCIA. 1982. Detección de razas resistentes de *Botrytis cinerea* Pers., causante de la pudrición gris en vides, al fungicida benomyl. Simiente 52(1-2): 27-28.
- DELPE, C. J. and DEKKER, J. 1985. Fungicide resistance definitions and use of terms. EPPO Bulletin 15: 333-335.
- ELAD, V., SHABI, E. and KATAN, T. 1988. Negative cross resistance between benzimidazole and N-phenylcarbamate fungicides and control of *Botrytis cinerea* on grapes. Plant Pathology 37: 141-147.
- FARETRA, F., POLLASTRO, S. and DI TONNO, A. P. 1983. New natural variants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) coupling benzimidazole-resistance to insensitivity toward the N-phenylcarbamate diethofencarb. Phytopath. Medit. 28: 98-104.
- KATO, T., SUZUKI, K., TAKAHASHI, J. and KAMOSHITA, K. 1984. Negatively correlated cross-resistance between benzimidazole fungicides and methyl N-(3,5 Dichlorophenyl) carbamate. J. Pesticide Sci. 9: 489-495.

- LEROUX, P., GREDT, M., MASSENOT, F. and KATO, T. 1985. Activité du phenylcarbamate: S-32165 sur *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la vigne. Fungicides for Crop Protection. BCPC Monograph N° 31: 443-446.
- NAKAMURA, S., KATO, T., NOGUCHI, H., TAKAHASHI, J. and KAMOSHITA, K. 1986. Selective fungitoxicity of diethofencarb to benzimidazole resistant strains of *Botrytis cinerea* and its mode of action. Proceedings IV Congres sur la protection de la sante humaine et des cultures en milieu tropical. pp.: 176-182.
- NATHANIELS, N.Q.R., WILSON, K. and FLETCHER, T. 1985. Negative cross-resistance between benomyl and MDPC in British isolates of *Botrytis cinerea*, *Pseudocercospora herpotrichoides* and *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. Ann. Appl. Biol. 107: 151-154.
- OSSANDON, D. 1981. Control químico de *Botrytis cinerea* Pers. en vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Moscatel de Austria y detección de razas resistentes del hongo a fungicidas benzimidazólicos. Universidad Católica de Valparaíso, Escuela de Agronomía. (Tesis de grado para optar al título de Ing. Agr., mimeo.).
- SHABIE., KOENRAADT, H. and DEKKER, J. 1987. Negatively correlated cross-resistance to phenylcarbamate fungicides in benomyl-resistant *Venturia inaequalis* and *V. pirina*. Neth. J. Pl. Path. 80:165-168.
- van TUYL, J.M., DAVIDSE, L.W. and DEKKER, J. 1974. Lack of cross resistance to benomyl and thiabendazole in some strains of *Aspergillus nidulans*. Neth. J. Pl. Path. 80: 165-168.
- WAARD, M.A. de, and van NISTELROOY, J.G.M. 1983. Toxicity of fenpropimorph to fenarimol-resistant mutants of *Penicillium italicum* Neth. J. Pl. Path. 88: 231-236.