

**ESTADOS FENOLOGICOS SUSCEPTIBLES A *Botrytis cinerea* EN FRAMBUESO
(*Rubus idaeus*). INHIBICION DEL HONGO *in vitro* Y DETERMINACION
DE *B. cinerea* ENDOGENA EN FRUTOS¹**

**Susceptible growth stages of raspberry (*Rubus idaeus* cv. Heritage)
to *Botrytis cinerea*. Inhibition of the fungus *in vitro* and determination
of *B. cinerea* endogenous from in fruits**

**Andrea Torres P.² Mario Alvarez A.³ y
Antonio Morales M.⁴**

S U M M A R Y

The objective of this experiment was to determine the growth stage of raspberry plant cv. Heritage most susceptible stage to *Botrytis cinerea*. Rovral 50% WP was applied to protect the plants at five growth stages. The fruit were utilized to determine the endogenous or asintomatic form of *Botrytis cinerea*.

Simultaneously, an *in vitro* experiment was carried out with fungicides dietofencarb, SDS-65311, tebuconazole, and RH-7592, using benomyl and iprodione as standard fungicide.

The experiment showed that all the growth stages studied were equally susceptible to the infection of *B. cinerea*, the endogenous from being predominant. The best fungicide was dietofencarb and tebuconazole was the less effective.

INTRODUCCION

En los últimos años en Chile el cultivo de los frutales menores ha adquirido una creciente importancia. Esto se visualiza con el aumento de la superficie, de 1.420 ha que existían en 1965 a, 7.500 ha aproximadamente, en 1986.

Dentro de estos frutales, se encuentra el frambueso (*Rubus idaeus*), que alrededor de 1979, comenzó a ser una importante alternativa de producción que puede competir con frutales tradicionales. Las últimas estadísticas indican que existe una expansión de su cultivo tanto en hectareaje como de zonas donde se ha plantado. Se distribuye desde la IV a la X Región, concentrándose su cultivo en la zona Central (ODEPA, 1988).

El frambueso, es una planta que presenta pocos problemas fitosanitarios que incidan seriamente en los rendimientos (Sudzuki, 1981). Se estima que la pudrición causada por *B. cinerea* es la más importante en post-cosecha. Aún cuando pocos drupéolos de cada fruto acarrean un tipo de infección latente de *B. cinerea* en el campo, los cambios fisiológicos asociados con maduración pueden permitir el desarrollo de una fase agresiva de la enfermedad (Williamson y Mc Nicol, 1986).

Actualmente en Escocia es común detectar en muchas plantaciones de frambueso, razas patogénicas de *B. cinerea*, tolerantes a fungicidas, tales como metiltiofanato, carbendazim y benomyl. Respecto a los fungicidas pertenecientes a la dicarboximida (iprodione, vinclozolin, procimidone) ya han sido registradas en otros cultivos, razas de *B. cinerea* tolerantes (Katan, 1982, citado por Williamson y Mc Nicol, 1986).

La presente investigación tuvo los siguientes objetivos: 1) determinar el(los) estado(s) fenológico(s) más susceptible(s) del frambueso a *B. cinerea*; 2) determinar el comportamiento de fungicidas experimentales en la inhibición *in vitro* del hongo; y 3) determinar la presencia de *B. cinerea* en forma endógena o asintomática en frutos.

¹Recepción de originales: 10 de octubre de 1989.

Parte de la tesis presentada por Andrea Torres P., para optar al Título de Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²Sagrados Corazones 3820, Providencia, Santiago, Chile.

³Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

⁴Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile.

MATERIALES Y METODOS

Control químico en diferentes períodos fenológicos. Se realizó un ensayo de campo en el huerto Sociedad Agrícola Productos de Longaví S.A. (Linares). Incluyó plantas de frambueso de la variedad Heritage, de aproximadamente 1,20 m de altura, plantadas en octubre de 1987, las cuales presentaban estados fenológicos definidos y homogéneos previamente seleccionados. Los tratamientos se aplicaron empleando una bomba de espalda, de marca SOLO, de baja presión y alto volumen, de doce litros de capacidad. Se aplicó iprodione (Rovral 50% PM), en dosis de 150 g/hl, con un gasto por parcela de dos litros, en los siguientes cinco estados fenológicos y en las fechas señaladas: flor (26.01.88), caída de pétalos-fruto 5 mm de diámetro (02.02.88), fruto 6 mm de diámetro (09.02.88), fruto 8 mm de diámetro (16.02.88) y fruto 10 mm de diámetro (23.02.88). Estos estados correspondieron a los presentes en cada período en que se efectuaron las aplicaciones en las fechas señaladas.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1: Rovral 50% en los cinco estados fenológicos
- T2: Rovral 50% en los cuatro primeros estados fenológicos
- T3: Rovral 50% en los tres primeros estados fenológicos
- T4: Rovral 50% en los dos primeros estados fenológicos
- T5: Rovral 50% en el primer estado fenológico
- T6: Rovral 50% en el quinto estado fenológico
- T7: Rovral 50% en el cuarto y quinto estado fenológico
- T8: Rovral 50% en el tercer, cuarto y quinto estado fenológico
- T9: Rovral 50% en el segundo, tercer, cuarto y quinto estado fenológico
- T10: Testigo sin fungicida.

Se usó un diseño de bloques completamente aleatorizados con diez tratamientos y cuatro repeticiones. Cada bloque fue aislado del contiguo por dos hileras borde. La unidad experimental (parcela) comprendió quince plantas; las parcelas se separaron entre sí por cuatro o cinco plantas como borde.

La fruta fue cosechada tres semanas después de la última aplicación, seleccionada y embalada según criterios utilizados para exportación, en cajas de cartón de capacidad de 180 g, cubiertos con celofán transparente. Estas cajas fueron colocadas con la misma distribución de los tratamientos en el

campo; en cuatro bandejas de seis pintas (1 pinta: aproximadamente 400 g) de capacidad, por repetición, que se ubicaron al azar dentro de una caja contenedora. Se almacenaron a 0°C en una cámara frigorífica, por tres o seis días y dejadas luego un día a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se determinó presencia o ausencia de *B. cinerea* endógena, revisando individualmente cada fruto. Los datos obtenidos se procesaron a través del análisis de variancia, y las medias fueron separadas mediante prueba de Duncan (5%).

Determinación de actividad fungicida *in vitro*. Se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Estación Experimental La Platina. Se utilizaron los fungicidas experimentales: SDS-65311, 50% PM (Ciba-Geigy); dietofencarb, 50% PM (Sumitomo Japón/Bayer); tebuconazol, 25% PM (Bayer); RH-7592, 24% EC (Rohm and Haas) y dos fungicidas comerciales: benomilo (Benlate 50% PM) e iprodione (Rovral 50% PM) como patrón de comparación y se calculó la dosis (concentración) efectiva para inhibir el 50% del crecimiento de *B. cinerea*.

Los fungicidas se adicionaron al medio de cultivo de agar papa dextrosa (APD) en placas Petri, en las siguientes concentraciones: 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 y 10 mg i.a./lt. Se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizados con 37 tratamientos y cuatro repeticiones. La unidad experimental fue la placa Petri.

El aislamiento de *B. cinerea* se obtuvo a partir de un cultivo nuevo (48 horas) sin esporular. Mediante un sacabocado se sacó desde los bordes de crecimiento de la colonia, un cilindro que contenía micelio del hongo, el cual fue colocado en las placas con APD + fungicida, las que se mantuvieron a 22°C por 48 horas, al cabo de lo cual se midió el crecimiento de la colonia mediante dos mediciones efectuadas en ángulo recto. A la cifra resultante se le restó el diámetro del cilindro de agar original. El porcentaje de inhibición para cada concentración/fungicida se determinó relacionando el crecimiento de los discos con fungicida, con los discos testigo sin fungicida.

Se efectuó análisis de variancia sobre el porcentaje de inhibición y las medias fueron separadas mediante prueba de Duncan (5%). Los valores de EC-50 (Effective Concentration: concentración necesaria para inhibir en un 50% el desarrollo del hongo) se calcularon a través de análisis de regresión del logaritmo de la concentración (mg i.a./lt) versus el porcentaje de inhibición respecto al testigo sin fungicida. Previamente los datos de

inhibición se transformaron a unidades Probit (Bliss, 1935).

B. cinerea endógena. Se utilizaron aproximadamente 25 frutos, aparentemente sanos, sacados al azar de cada parcela, los que se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% por dos minutos. Posteriormente se lavaron en agua estéril, se secó el exceso de agua, sobre una toalla de papel esterilizada y se colocaron en placas Petri, contenidas en recipientes plásticos, con papel filtro en el fondo. Los recipientes se cubrieron y se mantuvieron bajo condiciones de asepsia para prevenir la contaminación de la fruta. Se agregó 10 cc de agua destilada estéril a cada recipiente para proveer condiciones de humedad alta.

Se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizados con diez tratamientos y cuatro repeticiones. La unidad experimental fue el recipiente plástico.

Los recipientes se mantuvieron a temperatura ambiente, bajo régimen de luz natural, la fruta se examinó y evaluó después de un día, contabilizando el número de frutos que manifestaban estar afectados por *B. cinerea*. Los datos se procesaron a través del análisis de variancia, y las medias fueron separadas mediante prueba de Duncan (5%).

RESULTADOS Y DISCUSION

Control químico en diferentes períodos fenológicos. El porcentaje de frutos en los cuales se detectó *B. cinerea*, luego de haber sido almacenados durante tres y seis días a 0°C y 90% HR, seguido por un día a temperatura ambiente, se señalan en el Cuadro 1.

Con tres días de almacenaje a 0°C, seguido de un día a temperatura ambiente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En frutos almacenados por seis días, los tres primeros tratamientos fueron estadísticamente iguales entre sí y tuvieron un porcentaje de frutos con *B. cinerea*, que varió entre 15,3 y 17,1%. Estas cifras corresponden al menor porcentaje de frutos con pudrición del ensayo y son estadísticamente diferentes al tratamiento control que no recibió aplicación de Rovral en ninguno de los estados fenológicos y que presentó un 36% de pudrición de frutos por *B. cinerea*. A su vez, los tres primeros tratamientos son estadísticamente iguales al tratamiento seis y ocho, que son iguales al testigo. Esto demuestra que todos los estados fenológicos probados presentaron susceptibilidad a *B. cinerea*.

En la medida que aumentó el período de almacenaje en frío, se produjo un mayor deterioro de la fruta, lo que confirma que la frambuesa es un fruto altamente perecible y que la *B. cinerea* requiere de un período de incubación.

Una de las causas, que explicarían este alto porcentaje de frutos con pudrición puede estar asociada con las precipitaciones que ocurrieron durante el ensayo, cercanas a la cosecha.

Determinación de actividad fungicida in vitro. Los porcentajes de inhibición obtenidos para las diferentes concentraciones se señalan en el Cuadro 2.

A concentraciones de 0,01 mg/lt, tebuconazol, benomilo e iprodione, fueron estadísticamente iguales al tratamiento control, sin adición de fungicidas, en tanto que RH- 7592 y SDS-65311 fueron diferentes, pero iguales entre sí. El fungicida dietofencarb fue estadísticamente superior a todos los fungicidas probados.

En la concentración 0,1 mg/lt, dietofencarb continuó siendo el de mayor efecto inhibitorio. Los fungicidas RH-7592, iprodione y SDS-65311 presentaron una inhibición del hongo estadísticamente igual entre sí, inferior a benomilo y superior a terbuconazol y al testigo. A la concentración de 0,5 mg/lt, benomilo no tuvo diferencias significativas con dietofencarb, pero ambos fueron estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) a iprodione, SDS- 65311 y RH-7592; a su vez, estos últimos no difirieron entre sí. Tebuconazol fue inferior a los tratamientos fungicida, pero superior al testigo.

El porcentaje de inhibición a concentraciones de 1 mg/lt de iprodione y SDS-65311 fue estadísticamente similar a benomilo y, a su vez, este último, lo fue con dietofencarb. Los fungicidas antes señalados fueron diferentes ($P \leq 0,05$) a terbuconazol y RH-7592, y, a su vez, iguales entre sí.

A medida que aumentó la concentración del ingrediente activo de los fungicidas probados, éstos disminuyeron la eficiencia, siendo semejantes entre ellos. El fungicida experimental dietofencarb tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre *B. cinerea* en todas las concentraciones de activo ensayadas. El fungicida con menor inhibición del desarrollo micelar del hongo, fue tebuconazol.

Las concentraciones efectivas (EC-50) para inhibir el 50% del crecimiento del hongo se indican en el Cuadro 3.

CUADRO 1. Porcentaje de frutos de frambuesa con pudrición por *B. cinerea* en ensayo de control químico en diferentes períodos fenológicos.

Promedio de cuatro repeticiones

TABLE 1. Percentage of *B. cinerea* fruit rots in the different growth stages of raspberry under field test of chemical control. Average of four replications

Tratamiento	Estado Fenológico						Almacenaje ¹	
	flor	Caída petalos -fruto	fruto 6 mm	fruto 8 mm	fruto 10 mm	3 días	6 días	
		5 mm ³						
1	+ ⁴	+	+	+	+	4,4 a ²	15,9 c	
2	+	+	+	+	-	6,4 a	15,3 c	
3	+	+	+	-	-	6,7 a	17,1 c	
4	+	+	-	-	-	8,2 a	17,5 bc	
5	+	-	-	-	-	13,5 a	28,7 ab	
6	-	-	-	-	+	7,4 a	26,9 abc	
7	-	-	-	+	+	14,9 a	20,7 bc	
8	-	-	+	+	+	12,7 a	25,0 abc	
9	-	+	+	+	+	14,3 a	18,7 bc	
10	-	-	-	-	-	24,8 a	36,0 a	

¹Cámara de frío (0°C, 90% HR) seguido de un día a temperatura ambiente.

²Promedios unidos por una misma letra son iguales entre sí Duncan (5%).

³Diámetro.

⁴+: con fungicida; -: sin fungicida.

CUADRO 2. Porcentaje de inhibición de cuatro fungicidas experimentales y dos comerciales en crecimiento *in vitro* del micelio de *B. cinerea*, en seis concentraciones (mg/lt). Promedio de cuatro repeticiones

TABLE 2. Percentage of inhibition of four fungicide experimentals and two commercials in six different concentrations (mg/lt) on the growth of *B. cinerea in vitro*. Average of four replications

Fungicida	Concentración (mg l.a./lt)					
	0,01	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0
	% inhibición del crecimiento ¹					
Benomilo	12,6 bc ²	62,5 b	85,5 a	95,7 ab	100,0 a	100,0 a
Tebuconazol	15,1 bc	22,5 d	43,9 c	61,3 c	98,2 b	99,2 a
RH-7592	18,5 b	46,9 c	58,7 b	68,4 c	99,0 ab	100,0 a
Iprodione	6,1 bc	39,4 c	69,2 b	83,6 b	100,0 a	100,0 a
Dietofencarb	72,1 a	91,5 a	90,6 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
SDS-65311	18,8 b	46,4 c	62,2 b	83,7 b	100,0 a	100,0 a
Testigo	0,0 c	0,0 e	0,0 d	0,0 d	0,0 c	0,0 b

¹Luego de 48 horas de incubación a 22°C.

²Promedios unidos por la misma letra son iguales entre sí (Duncan 5%).

Los valores de EC-50 fueron: 0,003; 0,07; 0,08; 0,267 mg/lt para los fungicidas experimentales dietofencarb, SDS-65311, RH-7592 y tebuconazol, respectivamente, y 0,047 y 0,1 mg/lt para benomilo e iprodione, respectivamente.

De los fungicidas probados, dietofencarb obtuvo el menor EC-50, y tebuconazol el mayor, lo que indica que el primero necesitó menor cantidad de ingrediente activo para inhibir el 50% del desarrollo de *B. cinerea*. Los fungicidas SDS-65311 y RH-7592, tuvieron un EC-50 superior a benomilo e inferior a iprodione.

CUADRO 3. Determinación del EC-50 de los fungicidas experimentales y comerciales sometidos a la acción *in vitro* hacia *B. cinerea*, establecido a través de análisis de regresión entre dosis (log base 10) de los fungicidas y el porcentaje de inhibición del hongo (unidades Probits)

TABLE 3. Determination EC-50 of four fungicide experimentals and two commercials submitted to *B. cinerea* action *in vitro*, it was established through regression analysis between doses (log base 10) of the fungicide and percentage of fungus inhibition (Probits units)

Fungicida	Ecuación de Regresión	Coefficiente correlación	EC-50 (mg i.a./lt)
Benomilo	$Y = 7,5121 + 1,8910(\log x)$	0,96	0,047
Iprodione	$Y = 6,8505 + 1,8850(\log x)$	0,89	0,100
Dietofencarb	$Y = 8,0881 + 1,2312(\log x)$	0,88	0,003
SDS-65311	$Y = 6,7487 + 1,5305(\log x)$	0,81	0,070
Terbuconazol	$Y = 5,5188 + 0,9053(\log x)$	0,90	0,267
RH-7592	$Y = 6,6422 + 1,4809(\log x)$	0,86	0,080

CUADRO 4. Porcentaje de pudrición de frutos de frambuesa por *B. cinerea* endógena. Promedio de cuatro repeticiones

TABLE 4. Percentage of raspberry fruit rots caused by endogenous *B. cinerea*. Average of four replications

Tratamiento	Estado fenológico					Porcentaje ¹ promedio
	flor	Caída	fruto	fruto	fruto	
		pétalos	-fruto	6 mm ³	8 mm	
1	+ ⁴	+	+	+	+	13,3 h ²
2	+	+	+	+	-	24,4 g
3	+	+	+	-	-	35,7 f
4	+	+	-	-	-	44,3 e
5	+	-	-	-	-	56,2 d
6	-	-	-	-	+	83,6 b
7	-	-	-	+	+	63,0 c
8	-	-	+	+	+	51,9 d
9	-	+	+	+	+	35,6 f
10	-	-	-	-	-	97,9 a

¹ Cámara de frío (0°C, 90% HR) seguido de un día a temperatura ambiente.

² Promedios unidos por una misma letra son iguales entre sí, Duncan 5%.

³ Diámetro.

⁴ +: con fungicida; -: sin fungicida.

El fungicida experimental dietofencarb presentó un EC-50 superior a los dos fungicidas comerciales con los cuales se comparó. Ello indicaría que este fungicida sería un buen "botriticida". Tebuconazol tuvo un EC-50 inferior a los dos controles utilizados. La actividad fungicida *in vitro* de SDS-65311 y RH-7592, presentó valores intermedios, superior a benomilo e inferior a iprodione.

***B. cinerea* endógena.** Los resultados expresados en porcentaje de frutos de frambuesa con *B. cinerea*, se presentan en el Cuadro 4.

Todos los tratamientos que recibieron en el ensayo de campo al menos una aplicación de Rovral 50% PM, fueron estadísticamente diferentes al testigo, que no recibió aplicación. La eficiencia de control decreció en la medida que disminuyó el número de aplicaciones.

La aplicación de flor fue tan efectiva como tres aplicaciones en los últimos estados fenológicos, pero no es suficiente para un buen control. Al comparar tratamientos con igual número de aplicaciones, en los que recibieron la aplicación de flor, el control fue más eficiente.

CONCLUSIONES

1. Todos los estados fenológicos entre flor y fruto de 10 mm de diámetro fueron susceptibles a *B. cinerea*.
2. El fungicida experimental dietofencarb presentó una mejor acción inhibitoria *in vitro*, sobre el micelio de *B. cinerea* con un EC-50 de 0,003 mg i.a./lt. Tebuconazol ejerció una menor acción de

control (EC-50 de 0,267 mg i.a./lt) sobre *B. cinerea*. SDS-65311 y RH-7592 tuvieron un comportamiento similar a Rovral (EC-50 de 0,100 mg i.a./lt).

3. En el ensayo se detectó un predominio de *B. cinerea* endógena, determinándose para *B. cinerea* asintomática, que todos los estados fenológicos fueron importantes.

RESUMEN

En plantas de frambueso var. Heritage, se realizaron aplicaciones de Rovral 50% PM, en cinco estados fenológicos previamente seleccionados, con el fin de determinar cuáles estados eran más susceptibles a *B. cinerea*, y utilizando frutos de estas mismas plantas, determinar la presencia de *B. cinerea* en forma endógena o asintomática. Además se hicieron pruebas *in vitro* con los fungicidas experimentales dietofencarb (50% PM), SDS-65311 (50% PM), tebuconazol (25% PM) y RH-7592 (24% EC), los que fueron comparados con benomilo e iprodione.

Los resultados indicaron que todos los estados fenológicos probados fueron susceptibles a *B. cinerea* y que predominó en el ensayo *B. cinerea* de tipo endógena. El fungicida experimental que tuvo una mayor acción inhibitoria *in vitro* de *B. cinerea* fue dietofencarb y el que presentó la menor acción fue tebuconazol, en comparación con iprodione y benomilo, utilizados como fungicidas estándares.

LITERATURA CITADA

BLISS, C.I. 1935. The comparison for dosage-mortality data. Ann. App. Biol. 22: 307-333.

CHILE, ODEPA-Oficina de Planificación Agrícola. 1988. Estadísticas Agropecuarias 1975-1987. Santiago, Chile. p.: 137-177.

HARVEY, J.M. 1955. A method of forecasting decay in California storage grapes. Phytopathology 45: 229-232.

SUDZUKI, FUSA. 1981. La frambuesa. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales. Santiago, Chile. 111 p.

WILLIAMSON, B. and Mc NICOL, R.J. 1986. Pathways of infection of flowers and fruit of Red Raspberry by *Botrytis cinerea*. Acta Horticulturae 183: 137-141.