

DETERMINACION DE RAZAS RESISTENTES DE *Botrytis cinerea* DE VIDES A FUNGICIDAS DICARBOXIMIDAS¹

Identification of strains of *Botrytis cinerea* in grapes resistant to dicarboximide fungicides

Iris Carreño I.² y Mario Alvarez A.²

SUMMARY

Isolates of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. resistant to dicarboximide fungicides were isolated from a vineyard cv. Thompson Seedless, located in Pudahuel, Metropolitan Region of Chile. Dicarboximide fungicides have been widely used in this location to control grey mold.

Dicarboximide-resistant isolates were of low-level resistance, so the ED50 values found ranges from: 2.30 to 3.19, 0.60 to 3.50, and 1.40 to 7.00 for iprodione, vinclozolin and procymidone, respectively. These isolates were also dicloran-resistant, demonstrating cross-resistance.

INTRODUCCION

Botrytis cinerea Pers. Fr. causante de la pudrición gris de la vid, es controlado químicamente con varias aplicaciones de fungicidas durante el período susceptible a la enfermedad.

Los "botriticidas" más eficientes y, por consiguiente, los más usados son los benzimidazoles, dicarboximidias, dicloran y captan. El uso de estos productos está limitado a las normas de tolerancia en residuos de los países importadores, lo que reduce las posibilidades de su uso, favoreciendo el fenómeno de resistencia del hongo a los fungicidas.

Los casos de resistencia de hongos a fungicidas aparecieron con posterioridad a la introducción de los fungicidas sistémicos en 1962, aproximadamente (Besoain, 1989). Desde entonces los problemas ocasionados por esta causa han sido frecuentes. Es así como en 1979 en Chile se detectó resistencia de *B. cinerea* a benzimidazoles, en varias localidades del país, en aislamientos obtenidos de diversas variedades de uva de mesa (Alvarez, 1989).

Las dicarboximidias, que incluyen iprodione, procimidone y vinclozolin fueron desarrolladas a principios de la década de los años 70. Leroux, Fritz y Gredt (1977) establecieron en estudios de

laboratorio la presencia de razas de *B. cinerea* tolerantes a diclozolin, dicloran, quintozeno, vinclozolin y glicofeno. Katan (1982) determinó resistencia a las dicarboximidias, iprodione, vinclozolin y procimidone en cepas de *B. cinerea* aisladas de pepino, tomates, frutillas y berenjenas en invernadero.

En Nueva Zelandia, Hartill, Tomkins y Kleinsman (1983) informaron la resistencia a dicarboximidias, dicloran y quintozeno, en aislamientos obtenidos en invernaderos en diversas hortalizas. En este mismo país Beever y Brien (1983) establecieron en el campo y en varios cultivos, como vid, kiwi y frutilla, la presencia de razas resistentes a los fungicidas dicarboximidias, determinándose además resistencia cruzada entre iprodione con procimidone, vinclozolin y dicloran.

El presente trabajo tuvo por objetivo establecer la eventual presencia de razas resistentes a dicarboximidias aisladas desde parronales de la zona central del país, que habían sido sometidos a varios años de control con fungicidas pertenecientes a este grupo químico y su resistencia cruzada con dicloran.

MATERIALES Y METODOS

Prospección y determinación de resistencia

Durante la época de cosecha de 1988 se efectuaron muestreos en tres parronales ubicados en distintas localidades y con un manejo diferente en el uso de fungicidas para el control de *B. cinerea*. Las localidades fueron las siguientes:

¹Recepción de originales: 3 de noviembre de 1989.

Trabajo realizado bajo Convenio de Investigación entre INIA y ACONEX Ltda.

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

Localidad 1: Viña conducida en espaldera (cv. Ribier), ubicada en la Estación Experimental La Platina (INIA), Región Metropolitana, y tratada ocasionalmente con dicarboximidas. Extracción de 25 muestras.

Localidad 2: Parronal para vino (cvs. Semillón y Sauvignon), ubicado en Tutuquén (Curicó), sin pulverizaciones previas de dicarboximidas. Extracción de 31 muestras.

Localidad 3: Parronal (cv. Sultanina), ubicado en Pudahuel (Región Metropolitana), tres sectores (I, II y III), correspondientes a respectivos cuarteles y sometidos previamente a repetidas aplicaciones de dicarboximidas; las últimas temporadas no se había logrado un buen control de *B. cinerea* con un programa de aplicaciones basado en benzimidazoles (benomilo) y dicarboximidas (iprodione). Extracción de 100 muestras.

Cada muestra consistió en un grano de uva que presentaba ataque de *B. cinerea* con micelio y esporas. De cada grano se sembró un conidióforo en un disco Petri con agar papa dextrosa (APD), sin fungicida; los discos se incubaron a temperatura ambiente durante 72 horas y se transfirieron a respectivos tubos de ensayo, para su almacenaje en refrigerador y uso posterior, siendo identificados por localidad y sector de muestreo.

Los fungicidas usados fueron: vinclozolin (Ronilan 50 PM), iprodione (Rovral 50 PM) y procimidone (Sumisclex 50 PM) en concentraciones de 5, 10 y 5 ppm de i.a., respectivamente. Estas concentraciones fueron superiores a los valores ED50 (Effective Dosage: "cantidad de producto necesario para inhibir el crecimiento de un hongo en un 50%") obtenidos en estudios con una raza sensible (Mario Alvarez A., INIA, comunicación personal).

En placas Petri que contenían APD con cada uno de los fungicidas, a las concentraciones mencionadas, se sembraron en forma equidistante cinco cilindros de agar con micelio incubado durante 48 horas correspondiente a los aislamientos de las diferentes localidades, además se incluyeron dos aislamientos uno sensible y otro resistente a iprodione obtenidos en laboratorio y considerados como testigos. Cada muestra fue también sembrada en medio sin fungicida para comprobar su viabilidad.

Se consideró aislamiento resistente a aquel que creció en medio con fungicida, comparándolo con la ausencia de crecimiento del testigo sensible y con crecimiento similar al testigo resistente de laboratorio.

Grado de resistencia a dicarboximidas

Se seleccionaron al azar nueve aislamientos considerados resistentes ya que crecieron en medio que contenía iprodione (10 ppm i.a.), vinclozolin (10 ppm i.a.) y procimidone (5 ppm i.a.); se incluyó además dos aislamientos testigos obtenidos en laboratorio, resistente y sensible, respectivamente. Estos once aislamientos se sembraron en placas con APD sin fungicida y se incubaron durante 72 horas a temperatura ambiente. Desde la periferia de la colonia se sacaron cilindros de agar y micelio, los que fueron transferidos al centro de diferentes placas, que contenían iprodione en concentraciones de 2,5; 5; 10 y 25 ppm i.a. Estas placas se incubaron durante 72 horas, midiéndose posteriormente el diámetro de la colonia.

Para cada aislamiento y concentración se estableció el porcentaje de inhibición referido al crecimiento del aislamiento sin fungicida, empleándose tres repeticiones por aislamiento y por cada concentración.

Los valores de ED50 se calcularon mediante análisis de regresión entre el logaritmo de la concentración y el porcentaje de inhibición, transformado a valores Probit.

Resistencia cruzada entre dicarboximidas y dicloran

En la determinación de resistencia cruzada se usaron los nueve aislamientos mencionados, incluyendo además dos aislamientos sensibles, uno obtenido del campo y otro del laboratorio.

Cada aislamiento fue traspasado desde los tubos originales a discos con APD sin fungicida, incubándose durante 72 horas. Desde la periferia de cada colonia se obtuvo el inóculo, que se colocó en respectivos discos con APD que contenían vinclozolin, iprodione, dicloran y procimidone en dosis de 2,5; 5; 10 y 25 ppm de i.a.

La evaluación del ensayo se efectuó a las 48 horas, midiéndose el diámetro de las colonias en los respectivos medios y concentraciones, luego se calculó el porcentaje de inhibición con relación al testigo sin fungicida, determinándose posteriormente los valores ED50.

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de resistencia

Considerando aislamientos resistentes a aquellos que crecieron en medio con fungicida, sólo se obtuvieron colonias resistentes provenientes del parronal cv. Sultanina ubicado en la zona de Pudahuel, donde las dicarboximidias se habían usado en forma permanente en los programas de control de *B. cinerea*. Los aislamientos procedentes de los cultivos de vides establecidos en Curicó o La Platina, no se desarrollaron en medio que contenía fungicida, situación explicada por el diferente manejo de fungicidas a que fueron sometidos. En Pudahuel se había usado dicarboximidias profusamente, en cambio en La Platina sólo se usaron ocasionalmente, y en Curicó, siendo vid vinífera, no se utilizaron, estableciéndose, por consiguiente, una relación positiva entre el uso de esos fungicidas y la ocurrencia de razas resistentes al grupo.

En el primer sector (I) muestreado en Pudahuel, se observan los mayores porcentajes de aislamientos resistentes a las tres dicarboximidias, comparados con los obtenidos en el sector III y en el sector II, en que no se detectaron (Cuadro 1).

Estos resultados sugieren asimismo una relación entre la intensidad del control químico y la proporción de razas resistentes pues los tres sectores muestreados del parronal cv. Sultanina en la localidad de Pudahuel habían sido sometidos a diferentes programas de pulverizaciones con una menor frecuencia en el uso de dicarboximidias en el II.

Por otra parte, de los 100 aislamientos recolectados, se determinaron 22 aislamientos resistentes a una o más dicarboximidias (Cuadro 2). Dos aislamientos fueron resistentes sólo a procimidone. Trece fueron resistentes a procimidone y vinclozolin o iprodione, no determinándose ninguno resistente a vinclozolin e iprodione. Siete aislamientos resultaron ser resistentes a las tres dicarboximidias.

En estudios paralelos al presente trabajo se estableció que todas las razas resistentes a dicarboximidias también lo eran a benzimidazoles, lo cual sugiere que la resistencia a ambos grupos se debió a un intenso programa de control que incluía fungicidas representantes de ambos grupos químicos. Resultados similares fueron encontrados por Beever y Brian (1983), Katan (1982) y Leroux y otros (1977).

CUADRO 1. Porcentaje de aislamientos de *B. cinerea* procedentes de tres sectores de un parronal cv. Sultanina, de Pudahuel, que crecieron en medios artificiales conteniendo vinclozolin (5 ppm), iprodione (10 ppm) o procimidone (5 ppm)

TABLE 1. Percentage of isolates of *B. cinerea* collected from three sectors of a vineyard cv. Thompson Seedless located in Pudahuel, which sustained growth in artificial media amended respectively, with vinclozolin (5 ppm), iprodione (10 ppm) or procymidone (5 ppm)

Sector muestreado	Número de aislam.	Fungicidas		
		Vinclozolin	Iprodione	Procimidone
I	25	40,0	28,0	50,0
II	13	0,0	0,0	0,0
III	62	13,0	3,2	11,3

El 40 y 13% de aislamientos resistentes a vinclozolin encontrados en los sectores I y III, respectivamente, fueron similares a los determinados para procimidone con 50 y 11,3%, en los mismos sectores.

Con respecto a iprodione, el cual se utilizó en dosis mayores (10 ppm) que vinclozolin y procimidone, se obtuvo un 28 y 3,2% de aislamientos resistentes, siendo estos valores menores que los obtenidos para las otras dos dicarboximidias.

Nivel de resistencia a iprodione

Las cifras ED50 obtenidas para los nueve aislamientos resistentes fluctuaron entre 2,30 y 3,19 ppm i.a., indicando un bajo grado de resistencia a este fungicida (Cuadro 3). No obstante, el aislamiento sensible de campo (P-6) no fue capaz de desarrollarse a la concentración de 2,5 ppm i.a. de iprodione, similar a lo ocurrido con el testigo sensible (TS) de laboratorio. El testigo resistente (TR) de laboratorio

CUADRO 2. Número de razas de *B. cinerea* que demostraron poseer resistencia a una o más dicarboximidas, sobre un total de 100 aislamientos recolectados de un parronal cv. Sultanina

TABLE 2. Number of strains of *B. cinerea* resistant to one or more dicarboximides over a total of 100 isolates collected from a vineyard cv. Thompson Seedless in Pudahuel

Fungicida	Aislamientos resistentes
Procimidone	2
Procimidone y Vinclozolin	11
Procimidone e Iprodione	2
Procimidone, Iprodione y Vinclozolin	7
Total	22

El valor ED50 promedio de los aislamientos considerados resistentes fue de 2,65 ppm i.a., cifra que confirma el bajo grado de resistencia de la muestra utilizada.

Los aislamientos de *B. cinerea* obtenidos en este estudio corresponden a un bajo nivel de resistencia a dicarboximidas, de acuerdo al criterio propuesto por Beever y Brien (1983), quienes establecieron que el crecimiento de las razas con alto nivel de resistencia eran aquellos en que el hongo crecía sobre un 84% en el medio que contenía hasta 10 ppm i.a. de fungicida.

De acuerdo al criterio utilizado por Hoksbergen y Beever (1984) las razas resistentes aisladas en el presente trabajo serían de un bajo nivel de resistencia; ellos establecieron para esta categoría concentraciones entre 2 a 10 ppm, en tanto que las con alto nivel de resistencia se consideraron por sobre 10 ppm i.a.

CUADRO 3. Determinación del ED50 de iprodione sometido a la acción *in vitro* hacia 10 aislamientos de *B. cinerea*, obtenidos de vid cv. Sultanina procedentes de Pudahuel y 2 aislamientos testigo de laboratorio

TABLE 3. Determination of ED50 values of iprodione tested *in vitro* against 10 isolates of *B. cinerea* collected from a vineyard cv. Thompson Seedless in Pudahuel and 2 control isolates selected in laboratory

Nº aislamiento en Pudahuel	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación	ED50 ¹ ppm de i.a.
P-1	$Y = 3,28 + 3,59 \log x$	0,94	3,01
P-3	$Y = 2,84 + 4,45 \log x$	0,74	3,05
P-6 ²	sensible	-	-
P-8	$Y = 3,14 + 3,69 \log x$	0,94	3,19
P-11	$Y = 3,57 + 3,52 \log x$	0,79	2,74
P-23	$Y = 3,14 + 4,62 \log x$	0,85	2,50
P-25	$Y = 3,95 + 3,50 \log x$	0,90	2,32
P-39	$Y = 3,95 + 2,74 \log x$	0,97	2,40
P-70	$Y = 3,63 + 3,60 \log x$	0,83	2,40
P-99	$Y = 3,64 + 3,83 \log x$	0,87	2,30
TS ³	sensible	-	-
TR ⁴	resistente	-	> 25,00

¹Valores obtenidos a través de análisis de regresión entre la dosis 2,5; 5; 10 y 25 ppm i.a. de iprodione (log base 10) y el porcentaje de Inhibición transformado a valores Probit.

²Aislamiento sensible de campo, el cual no creció aun en la dosis mínima utilizada de iprodione.

³Aislamiento testigo sensible de laboratorio, el cual no creció aun en la dosis mínima utilizada de iprodione.

⁴Aislamiento testigo resistente a iprodione obtenido en laboratorio que creció aun en la dosis máxima utilizada del fungicida.

se desarrolló completamente a la más alta concentración utilizada, estimándose por lo tanto un valor ED50 sobre 25 ppm i.a. para este aislamiento.

Los resultados aquí señalados concuerdan con los obtenidos por Katan (1982), quien estableció un ED50 promedio (ppm i.a.), de 3,5 a 4,2 para vinclozolin; 1,0 a 2,2 para iprodione y 1,2 a 2,8 para procimidone.

Beever y Brian (1983) no encontraron para el caso de razas con bajo nivel de resistencia a dicarboximidas un control deficiente de *B. cinerea* en vides o una disminución de la eficiencia de vinclozolin en frutillas. Esta situación es común para estas especies, en tanto que las pérdidas económicas por fallas en el control han sido frecuentes en hortalizas, ornamentales y flores.

Razas con alto nivel de resistencia a dicarboximidias han sido detectadas ocasionalmente en el campo, existiendo pocos casos de ineficacia en el control de la enfermedad a nivel de terreno (Beever y Brien, 1981). Esto ha sido atribuido a una baja adaptabilidad de estas cepas en relación a las silvestres (Davis y Dennis, 1981).

Según Hartill y otros (1983) aquellos fungicidas que presentan alta resistencia (sobre 100 ppm) presentan baja adaptabilidad; por contraste, aquellos de baja resistencia (menores a 10 ppm) pueden presentar tanto adaptabilidad como las sensibles.

Aparentemente la situación con fungicidas dicarboximidias difiere de lo ocurrido para el grupo de los benzimidazoles, donde la presencia de razas resistentes al grupo se ha traducido invariablemente en un ineficiente control de la enfermedad. Esto sugiere que la diferencia se debería a que las razas resistentes a benzimidazoles muestran adaptabilidad similar a las sensibles.

Los resultados obtenidos en este estudio no permiten establecer si las razas resistentes serán o no controladas a nivel de campo con dicarboximidias al igual que lo son las sensibles.

Establecimiento de resistencia cruzada entre dicarboximidias y dicloran

En el Cuadro 4 se exponen los valores ED50 ppm i.a. de iprodione, vinclozolin, procimidone y dicloran determinados para los nueve aislamientos utilizados en el establecimiento del nivel de resistencia a iprodione, incluyendo a los aislamientos sensibles.

Se observa que los dos testigos sensibles se desarrollaron escasamente en dicloran, determinándose un ED50 de 0,3 ppm i.a. en ambos casos y no crecieron a las dosis mínimas de iprodione, vinclozolin y procimidone.

Los aislamientos considerados como resistentes a iprodione se desarrollaron con este fungicida, como, asimismo, con las otras dos dicarboximidias y dicloran; por lo tanto, se demuestra la resistencia cruzada entre estos fungicidas.

El ED50 promedio, obtenido para las razas resistentes a iprodione, vinclozolin, procimidone y dicloran, fue de 2,65; 1,89; 3,83 y 6,74 ppm i.a., respectivamente.

CUADRO 4. Determinación del ED50 de los fungicidas iprodione, vinclozolin, procimidone y dicloran sometidos a 10 aislamientos de *B. cinerea* obtenidos de vid cv. Sultanina provenientes de Pudahuel y un aislamiento testigo sensible de laboratorio

TABLE 4. Determination of ED50 values of iprodione, vinclozolin, procymidone and dicloran tested against 10 isolates of *B. cinerea* collected from a vineyard cv. Thompson Seedless in Pudahuel and a control isolate selected in laboratory

Nº aislamiento en Pudahuel	Valores ED50 en ppm i.a. ¹			
	Iprodione	Vinclozolin	Procimidone	Dicloran
P-1	5,9	1,9	6,4	8,0
P-3	1,0	1,3	2,3	3,8
P-6 ²	-	-	-	0,3
P-8	3,6	3,2	7,0	8,0
P-11	2,5	3,5	7,6	8,6
P-23	2,0	1,6	1,4	7,5
P-25	1,0	0,6	1,7	5,2
P-39	2,1	1,9	3,7	6,7
P-70	1,6	1,9	2,4	7,5
P-99	2,5	1,2	2,0	5,4
TS ³	-	-	-	0,3

¹Los valores ED50 se determinaron mediante análisis de correlación entre el porcentaje de inhibición versus el logaritmo de la concentración de los fungicidas (2,5; 5; 10 y 25 ppm i.a.).

²Aislamiento sensible de campo, el cual no creció en las dosis mínimas utilizadas de Iprodione, vinclozolin y procimidone.

³Aislamiento testigo sensible de laboratorio; no creció en las dosis mínimas utilizadas de Iprodione, vinclozolin y procimidone.

La resistencia cruzada con el hidrocarburo aromático dicloran coincide con lo encontrado por

Katan (1982) quien además estableció un ED50 de 3,7 a 6,2 que es similar al establecido en el presente trabajo.

RESUMEN

Razas de *B. cinerea*, resistentes a dicarboximidias se detectaron en un parronal de vid cv. Sultanina, ubicado en la zona de Pudahuel, donde estos fungicidas fueron usados permanentemente en los programas de control. Estas razas resistentes no se encontraron en aquellos lugares en que se habían utilizado en forma restringida o no usado productos pertenecientes a este grupo.

El nivel de resistencia de las razas a las dicarboximidias fue considerado bajo y las cifras ED50 ob-

tenidas, y expresadas en ppm i.a., fluctuaron entre 2,3 y 3,19 para iprodione; 0,60 y 3,50 para vinclozolin y 1,40 y 7,00 para procimidone.

Estos aislamientos además fueron resistentes a dicloran, el ED50 promedio obtenido para este producto fue de 6,74 ppm i.a., estableciéndose así resistencia cruzada entre las dicarboximidias y dicloran.

LITERATURA CITADA

- ALVAREZ A., MARIO. 1989. Resistencia a los fungicidas, fundamentos y aspectos prácticos. En: Latorre B. (ed.). Fungicidas y Nematicidas avances y aplicabilidad. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. p.: 125-138.
- BEEVER, R.E. and BRIEN, H.M.R. 1983. A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. New Zealand Journal of Agricultural Research 26: 391-400.
- BESOAIN C., XIMENA. 1989. Benzimidazoles. En: Latorre B. (ed.). Fungicidas y Nematicidas avances y aplicabilidad. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. p.: 17-28.
- DAVIS, R.P. and DENNIS, C. 1981. Studies on the survival and infective ability of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea*. Ann. Appl. Biol. 98: 395-402.
- HARTILL, W.F.T., TOMKINS, G.R., and KLEINSMAN, P.J. 1983. Development in New Zealand of Resistance to dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*, to acylalanines in *Phytophthora infestans*, and to guatazine in *Penicillium italicum*. New Zealand Journal of Agricultural Research 26: 261-269.
- HOKSBERGEN, K.A. and BEEVER, R.E. 1984. Control of low-level dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* by dicarboximide fungicides. New Zealand Journal of Agricultural Research 27: 107-111.
- KATAN, T. 1982. Resistance to 3.5 dichlorophenyl-N-cycle imide (dicarboximide) fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. Plant Pathology 31: 133-141.
- LEROUX, P., FRITZ, R. et GREDET, M. 1977. Etudes en laboratoire de souches de *Botrytis cinerea* Pers., résistantes a la dichlozoline, au dicloran, au quintozone, a la vinchlozoline et au 26091 RP (ou glycophene). Phytopathologische Zeitschrift 89: 347-358.