

Acción fungitóxica «in vitro» del benomilo, triforina y thiocur

I. GIMÉNEZ VERDÚ

Esta labor está basada en el estudio de la sensibilidad «in vitro» de *Cladosporium cucumerinum*, *Penicillium expansum*, *Phoma tracheiphila*, *Alternaria tenuis* y *Monilia cinerea*, frente a estos sistémico. Mediante las distintas modalidades de ensayo y concentraciones de producto utilizadas, se pretende poner de manifiesto la capacidad inhibitoria de los compuestos y la respuesta de sensibilidad de las cepas empleadas.

Aparte de situar los citados agentes mediante unas notas conceptuales sobre su sistemática y actividad parasitaria, se exponen algunas observaciones sobre la forma de actuar de los fungicidas sistémicos. Asimismo se da idea de la dificultad de dosificar un producto en un ensayo y del diferente comportamiento de las cepas «in vitro» y en la naturaleza al respecto, sin olvidar el que se puedan evidenciar tras los tratamientos posibles fenómenos de resistencia, producidos a través de un proceso de selección o de mutación no dirigida. Se indica también que el factor tolerancia puede venir expresado en la naturaleza de distintas formas y su relación con la supervivencia de una cepa.

Por otro lado, se expone la actual tendencia de muchos trabajos en averiguar la clave de incidencia de la acción tóxica de un compuesto sobre la fisiología de los hongos, citando su efecto sobre un micosterol, el ergosterol, por su implicación en las funciones de permeabilidad y selectividad de la membrana, crecimiento y reproducción sexual.

I. GIMÉNEZ VERDÚ. Departamento de Biología Vegetal I. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.

Palabras clave: tolerancia, cepas, principio activo, concentración, suspensión.

INTRODUCCION

Cl. cucumerinum Ell. et Arth., es un frecuente parásito de diversas Cucurbitáceas, como el melón y pepino.

Pertenece al Gén. *Cladosporium* Lk. de la Fam. *Dematiaceae*, que se incluye en el Or. *Hyphales* de la Cl. *Deuteromycetes*.

P. expansum Lk., si bien puede desarrollarse sobre frutos de diversas especies, es particularmente frecuente sobre manzanas y peras, a las que origina manchas de podredumbre.

Pertenece al Gén. *Penicillium* Lk. de la

Fam. *Mucedinaceae*, también incluida en el Or. *Hyphales* y Cl. *Deuteromycetes*.

Ph. (Deuterophoma) trachiphila (Petri) Kanc et Ghick., Deuteromiceto Sphaeropsidal descrito por PETRI (1929) como *Deuterophoma tracheiphila* PETRI, posteriormente propuesto por CICCARONE (1971) para su pertenencia al Gen. *Phoma*.

Produce la grave traqueomicosis de los Cítricos denominada «mal secco», en especial del limonero.

A. tenuis Nees, perteneciente al Gén. *Alternaria* Nees, se incluye en la Fam. *Dematiaceae*.

tiaceae del Or. *Hyphales*, dentro de los *Deuteromycetes*.

Esta especie es extremadamente polífaga, capaz de intervenir de forma aislada o en combinación con otros agentes en el desarrollo de múltiples alteraciones, como la caries del trigo u otras manchas negras de éste y otros cereales, tizones o negrillas. Su poder patógeno es débil, por lo que generalmente ataca plantas u órganos debilitados.

Monilia cinerea Bon. (*M. laxa*), está en relación metagenética con *Monilinia laxa* (Aderh. et Ruhl) Honey., Ascomiceto Helotial de la Fam. *Helotiaceae*, parásito de pomáceas y drupáceas. La moniliosis determina la conocida «momificación de los frutos».

Según WUEST *et al.* (1973), los fungicidas sistémicos pueden actuar afectando la fisiología reproductiva, dañando la formación de esporas, el proceso germinativo, o ambos. Así dicho autor, en sus ensayos «in vitro» sobre la sensibilidad al benomyl de cepas de *P. malthousei*, midió, además del crecimiento micelial, la esporulación y la germinabilidad de las esporas.

En cuanto a acertar las concentraciones límites de fungicida a utilizar, KURAMOTO (1976) realizó pruebas con aislamientos de *P. digitatum* y *P. italicum* en relación al benomyl y metiltiofanato, con idea de determinar la mínima cantidad de fungicida con la cual no aparece crecimiento y la máxima cantidad que no le afecta. Se valieron para ello de la medida del diámetro de crecimiento de las colonias, y sugirieron entre sus observaciones, que a bajas concentraciones suele ser difícil determinar la máxima concentración que no inhibe el crecimiento.

No obstante, es sabido que la capacidad de inhibición de los productos «in vitro» frente al crecimiento de colonias, presenta frecuentemente grandes diferencias con su actividad a concentraciones similares en la naturaleza, si bien sirva de referencia. En consonancia con esto, SCHREIBER y TOWNSEND (1976) describen la disparidad exis-

tente en el control de *Ceratocystis ulmi* con benomyl y MBC-HCL, ya que «in vitro» a ciertos aislamientos les fueron tóxicas concentraciones de 1 µg/ml, en cambio observaron que otros que crecieron el 30 % de cuanto lo hizo el control a concentración de 1.000 µg/ml, en las ramas de los árboles podían soportar concentraciones no comparables.

Otro factor a considerar en la relación entre la facultad de inhibición de los compuestos y la sensibilidad de las cepas confrontadas, es la existencia de una tolerancia natural observada en muchas de éstas. Por este motivo, una serie de indagaciones han sido encaminadas a determinar esta tolerancia en aislamientos provenientes de plantaciones no tratadas, ya que los tratamientos facilitan la selección y en muchos casos favorecen la aparición de cepas resistentes. Con esta idea y entre otros muchos autores, HARDING (1972) verificó estudios en cepas de *P. digitatum* y *P. italicum* frente al tiabendazol, WUEST *et al.* (1973) con aislamientos de *Verticillium malthousei* en relación al benomyl, SCHREIBER y TOWNSEND (1976) con cepas de *Ceratocystis ulmi* frente a MBC-HCL.

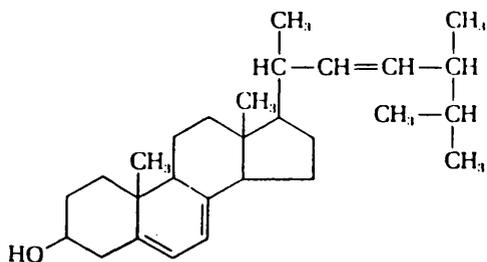
A partir de los trabajos realizados sobre este argumento se ha podido deducir, que son múltiples las formas en que esta tolerancia puede quedar expresada. Así, MACKENZIE (1970) y MACKENZIE *et al.* (1971), observaron que en *Cochliobolus carbonum* Nelson existía un gen tolerante a los compuestos de cadmio y al antibiótico Actidione, expresándose la resistencia en un aumento de la tasa de crecimiento y en una reducción de la germinación de esporas.

Por otra parte, estudios de WUEST *et al.* (1974), expresan que ha sido observado el hecho de que el factor tolerancia no es suficiente para la supervivencia de una cepa, ya que en la población de un parásito en la naturaleza pueden desaparecer cepas tolerantes por ser necesarias para su supervivencia otras peculiaridades, como son la capacidad reproductiva y patogénica competente en relación con las cepas sensibles en

convivencia, sin descontar agresividad y virulencia.

Como nota final podemos añadir que existen grupos de resistencia específicos en Comicetos, Mucorales.

En los últimos años, muchas experiencias de laboratorio, tienden a poner de manifiesto la clave de incidencia de la acción fungitóxicas de un producto. Con este fin se realizan estudios tales como los que intentan dilucidar la acción inhibitoria de algunos sistémicos en la biosíntesis del ergosterol, micosterol presente en hongos y levaduras, que se convierte en vitamina D por irradiación solar. Se obtiene industrialmente en cantidades considerables como subproducto de la preparación de alcaloides del «cornezuelo» del centeno y a partir de las levaduras. Tiene de fórmula:



La importancia del estudio de la incidencia de los sistémicos en el ergosterol radica en que éste es el principal esteroles de los hongos, constituye uno de los componentes de membrana interviniendo en su permeabilidad (ELLIOTT, 1977), siendo la función de la membrana la principal función de los esteroides.

Hechos que ponen de manifiesto la función esencial de estas sustancias en los hongos, y lo demuestran observaciones como las realizadas en miembros del género *Phythium* y *Phytophthora* los cuales aumentan su crecimiento y producción de esporangios añadiendo esteroides al medio, siéndoles además necesarios para su reproducción sexual (ELLIOTT, 1977).

LEROUX *et al.* (1976) señalan que algunos productos entre los que figura la trifo-

rina, parece que actúan sobre *P. expansum* y *Cl. cucumerinum*, bloqueando la desmetilación oxidativa de los precursores del ergosterol. DE WAARD y FUCHS (1982) precisan que dicho compuesto inhibe la síntesis del ergosterol en la demetilación del carbono en posición 14. Asimismo citan la presencia de una clara resistencia cruzada entre las cepas mutantes. En relación a esto y como es sabido, cabe recordar que en el suministro de un fungicida es muy importante conocer el grado de especificidad de su modo de acción, ya que si actúa de modo similar a otros fungicidas se puede dar este fenómeno.

LEROUX y GREDT (1978), en estudios sobre estos compuestos ponen de manifiesto que la inhibición de la biosíntesis del ergosterol por algunos productos, se ha visto acompañada por un acúmulo de sus precursores, indicando además en ensayos relacionados la ocurrencia de cambios cualitativos y cuantitativos en esteroides, provocados por algunos compuestos en las basidioesporas —esporidios— de algunos *Ustilaginales*.

Uno de los aspectos a tener en cuenta a nivel de la permeabilidad de membrana, es por ejemplo el hecho de que algunos fungicidas producen a baja concentración cambios en su selectividad, siendo la fuga de iones K^+ el primer suceso detectable. A altas concentraciones se da una fuga de aminoácidos y de otros metabolitos y a concentraciones subletales causan la fuga de K^+ y hacen a la hifa libremente permeable a azúcares y otros compuestos que normalmente no pueden penetrar rápidamente.

En otras experiencias sobre la incidencia de la acción fungitóxicas de algunos compuestos se ha creído observar que radica más en el micelio que en las esporas, y que asimismo parece darse una reducción en el crecimiento de las plantas y una inhibición en la síntesis de las giberelinas (LEROUX *et al.*, 1976).

Terminamos indicando que entre las múltiples experiencias que se realizan, algunas señalan un diverso comportamiento de la acción inhibitoria de algunos productos

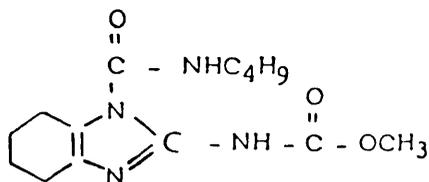
como el benomyl, sobre los enzimas extracelulares existentes en un filtrado de cultivo de *Cl. cucumerinum*, crecido en presencia de una dosis subletal de este compuesto (MONISTROL *et al.*, 1988).

Como nota complementaria cabe recordar que en la práctica se suministran con frecuencia los sistémicos con sustancias coadyuvantes (MOLDZYNSKA y REJURAN, 1977), que permiten una mayor rapidez de absorción, acúmulo y persistencia en la planta, como se observa en los bioensayos de sistemicidad efectuados con porciones de órganos provenientes de plantas tratadas, todo lo cual se traduce en una mayor actividad en el control de la enfermedad (GIMÉNEZ y DE CICCIO, 1978).

MATERIAL Y METODOS

Los ensayos «in vitro» tenían por finalidad determinar la actividad de los fungicidas frente al crecimiento de las colonias. Las diversas concentraciones utilizadas estaban referidas a sus respectivos principios activos, así el benomyl se trataba de benlate al 50 % de su principio activo, la triforina al 19,4 %, a excepción del thiocur del cual durante el período de experimentación era todavía desconocida su composición, resultando posteriormente tratarse de un formulado al 51 % de su principio activo.

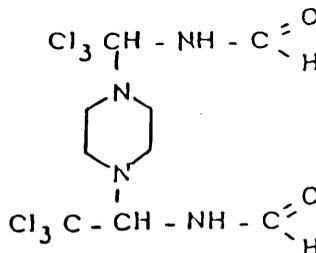
Del benomyl su ingrediente activo es el metil-1-(metilcarbamil)-2-bencimidazolcarbamat, o éster metílico del ácido 1-butilcarbamil-2-benzimidazolcarbámico, de fórmula estructural:



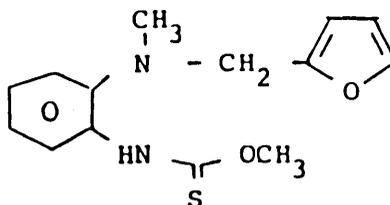
Entre otros efectos, inhibe la respiración inhibiendo la oxidación de la glucosa y acetato.

En solución da lugar a carbendazím y a un metabolito volátil de toxicidad selectiva conocido como butil-isocianato $C_4H_9-N=C=O$ (HAMMERSCHLAG y SISLER, 1973).

La triforina o saprol (CELA W 524) consiste en la N,N' -bis-(1-formoamida-2,2,2-tricloroetil)-piperazina, de fórmula estructural:



El thiocur (ex RH-3928) o furophanate, es la 2-furanil-metilén aminofenil amino tioximetilcarbamat de metilo, de fórmula estructural:



En estas experiencias se empleó como substrato agar-patata-dextrosa (PDA), a pH 5,6-5,9, usándose placas Petri de 90 mm de diámetro, a razón de 15 ml por placa.

Para el crecimiento de las colonias, las placas eran mantenidas en termostato a 22 °C y en la oscuridad.

PRUEBAS Y RESULTADOS

Se realizaron tres tipos de ensayos:

I. Aplicando los fungicidas directamente sobre la superficie del substrato:

En placas con PDA sembradas por nebulización con una suspensión de hongo, se

disponían simétricamente tres círculos de papel de filtro de 7 mm de diámetro, que eran humedecidos con 50 µl de una solución de producto.

La suspensión de hongo se realizaba en agua estéril y se obtenía filtrando en gasa una suspensión de micelio, el cual había crecido en tubo inclinado con sustrato de PDA. La suspensión era realizada en agua estéril.

Los hongos utilizados fueron: *Penicillium expansum*, *Phoma tracheiphila* y *Alternaria tenuis*.

Las concentraciones de fungicidas utilizadas fueron: 10-25-50-100-200-500-1000-2000 µg/ml.

Las medidas de los posibles halos de inhibición formados en torno a los círculos de papel, se efectuaban cada 48 horas y eran relacionados con la cantidad de producto contenida en los 50 µl de solución, deduciéndose así la actividad inhibidora de los fungicidas a cada concentración y hongo ensayado.

Resultados:

— El benomyl inhibió el crecimiento de las colonias de *Ph. tracheiphila* y *P. expansum*, a todas las concentraciones.

— El thiocur presentó actividad desde la concentración de 200 µl/ml en adelante, inhibiendo especialmente el crecimiento de colonias de *P. expansum*.

— La triforina no fue activa frente al crecimiento de las colonias de los hongos ensayados.

— El orden decreciente de la actividad de los fungicidas frente al crecimiento de los hongos fue: benomyl, thiocur y triforina.

— *A. tenuis* no presentó sensibilidad a ningún producto.

II. Aplicando el fungicida en el interior del sustrato por inyección:

En esta prueba, la técnica consistía en colocar simétricamente sobre el sustrato de las placas, dos discos de colonias de 7 mm de diámetro de igual peso y edad (8 días),

procedentes del margen de la colonia originaria.

Los hongos ensayados fueron: *Monilia cinerea*, *P. expansum* y *Ph. tracheiphila*.

Las concentraciones de producto fueron: 0-0,1-1-10 µg/ml y eran incluidas en el sustrato poco antes de verterlo en las placas, estabilizándose previamente las temperaturas de los matraces contenedores de las respectivas dosis de sustratos, a 50 °C y al baño María, para evitar la degradación del fungicida.

Se realizaron tres placas por concentración y hongo, así como tres placas para los controles.

Las medidas de los diámetros de crecimiento de las colonias se efectuaron al cabo de 7 y 14 días.

El porcentaje de inhibición de crecimiento de las colonias a cada concentración, se determinaba comparando su crecimiento con el de las respectivas colonias crecidas a 0 µg/ml de producto, considerando el diámetro de la placa como el de un crecimiento del 100 %.

Resultados:

— El benomyl mostró actividad inhibidora frente al crecimiento de las colonias de los tres hongos.

— El thiocur mostró particular acción inhibidora frente al crecimiento de las colonias de *P. expansum* desde la concentración de 10 µg/ml en adelante.

— La triforina mostró una débil actividad de inhibición frente al crecimiento de las colonias de los tres hongos.

— El orden decreciente de la actividad de los fungicidas frente al desarrollo de las colonias fue: benomyl, thiocur y triforina.

— *M. cinerea* no presentó prácticamente sensibilidad frente a la triforina, comportándose similarmente frente al thiocur.

III. Aplicando el fungicida incluido en el sustrato:

Este tipo de ensayo consistía en efectuar dos perforaciones cilíndricas simétricas en el sustrato de las placas, previa siembra de

Cuadro 1.—Medida (mm) de los halos de inhibición de *Penicillium expansum* y *Cladosporium cucumerinum* correspondientes a las diversas cantidades de producto depositadas en cada oquedad realizada en el sustrato

Cantidad de fungicida (µgr)	benomyl (a)	triforina (b)	thiocur (a)
25	15,5	6	3
50	19	7,4	8
100	21	9	11,4
200	24	15	18,8

(a) Benomyl
Thiocur Solamente se estudiaron sus acciones frente a *P. expansum*.

(b) Triforina Solamente se estudió su actividad frente a *Cl. cucumerinum*.

las mismas por nebulización con una suspensión del hongo (obtenida como en el ensayo I).

En las oquedades realizadas en el sustrato, era depositada la suspensión del producto en cantidad de 50 µl.

Los hongos utilizados fueron: *P. expansum* frente al benomyl y thiocur, y *Cl. cucumerinum* frente al benomyl y triforina.

Las concentraciones de producto ensayadas fueron: 250-500-1.000-2.000 µg/ml.

La medida del radio de los posibles halos de inhibición presentes en torno a las hoquedades del sustrato en que se había depositado el producto, se relacionaba con los 50 µl de producto depositado en las mismas, determinándose así la actividad del fungicida frente al crecimiento de las colonias.

Resultados:

Fig. I: Cuadro 1

— Frente al crecimiento de las colonias de *P. expansum*, presentó mayor actividad inhibitora el benomyl que el thiocur.

— La triforina mostró una efectiva actividad de inhibición frente a *Cl. cucumerinum*.

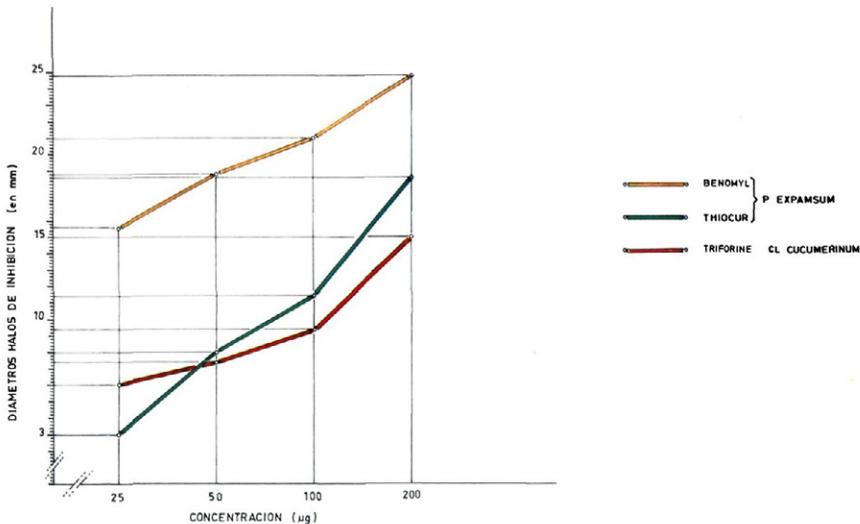


DIAGRAMA I

Halos de inhibición de *Penicillium expansum* y *Cladosporium cucumerinum* en función de la respectiva concentración de benomyl, thiocur y triforine.

Conclusión de los resultados obtenidos en estas pruebas:

En general, el orden decreciente de actividad de los productos frente al crecimiento de las colonias fue: benomyl, thiocur y triforina, mostrando una especial sensibilidad *P. expansum* al benomyl y thiocur y *Cl. cucumerium* a la triforina.

AGRADECIMIENTOS

Estos ensayos fueron realizados en el Dpto. de «Patología Vegetal» de la Fac. de «Agraria» de la Univ. de Bari (Italia). Recuerdo con gratitud la colaboración del Prof. V. De Cicco.

ABSTRACT

GIMÉNEZ VERDÚ, I. (1991): Acción fungitóxica «in vitro» del benomilo, triforina y thiocur. *Bol. San. Veg. Plagas*, 17 (3): 347-353.

A series of different «in vitro» essays have been carried out in order to ascertain the mode of activity of systemic fungicides benomyl, triforine and thiocur, on the growing of *Cladosporium cucumerinum*, *Penicillium expansum*, *Phoma tracheiphila*, *Alternaria tenuis* and *Monilia cinerea* colonies. In general, benomyl shows the highest inhibitory activity, followed by thiocur and triforina. On the other hand *P. expansum* are more sensitive to the effects of benomyl and thiocur whereas *Cl. cucumerinum* responds mostly to the effect of triforine.

Key words: Inhibitory activity, fungicides, «in vitro», growing colonies, sensitive response.

REFERENCIAS

- CICCARONE, A., 1971: Il fungo del «mal secco» degli Agrumi. *Phytopath. medit.*, 10: 68-75.
- DE WARRD, M. A.; FUCHS, A., 1982: Resistance to ergosterol biosynthesis inhibitors. En: *Fungicide Resistance in Crop Protection* (Eds. J. Dekker and S. G. Georgopoulos) PUDOC, Wageningen, pp. 86-98.
- ELLIOTT, C. G., 1977: Steroles in fungi. Their functions in growth and reproduction. *Adv. Microb. Physiol.*, 15: 121-173.
- GIMÉNEZ, I.; DE CICCO, V., 1978: Saggio di attività di due fungicidi sistemici verso il «mal secco» degli Agrumi. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1978: 407-415.
- HAMMERSCHLAG, R. S.; SISLER, H. D., 1973: Benomyl and methyl-2-benzimidazole carbamate (MBC). Biochemical, cytological and chemical aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 3: 42.
- HARDING, P. R. Jr., 1972: Differential sensitivity to thiabendazole by strains of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Plant. Dis. Repr.*, 56: 256-260.
- LEROUX, P.; GREDT, M., 1978: Effects of some systemic fungicides on the biosynthesis of ergosterol in *Botrytis cinerea* Pers., *P. expansum* Link. and *Ustilago maydis* (DC) Cda. *Annales de Phytopathologia*, 10: 45-60.
- LEROUX, P.; GREDT, M.; FRITZ, R., 1976: Similarities and differences between the modes of action of imazalil, triadimefon, triarimol and triforine. *Phytopathologie-Phytopharmacie*, 25(4): 37-333.
- MACKENZIE, D. R., 1970: Genetics of fungicide tolerance in a natural population of the plant pathogen *Cochliobolus carbonum* Nelson. *Ph. D. Tesis, The Pennsylvania State University*, 60 pp.
- MACKENZIE, D. R.; COLE, H. Jr.; NELSON, R. R., 1971: Qualitative inheritance of fungicide tolerance in a natural population of *Cochliobolus carbonum*. *Phytopathology*, 61: 458-462.
- MOLDZYNSKA, B.; REJURAN, S., 1977: Bioassays with *Penicillium* sp. for quantitative determination of fungicides. Part. I. Determination of benomyl and benomyl with adjuvants. *Fruit Science Reports*, 4: 43-50.
- MONISTROL, I. F.; PÉREZ LEBLIC, M. I.; LABORDA, F., 1988: Effect of sublethal dose of benomyl on extracellular enzyme production by *Cl. cucumerinum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 90: 193-197.
- PETRI, L., 1929: Sulla posizione sistemática del fungo parassita delle piante di limone affette da «mal secco». *Boll. Real. Staz. Pat. Veg.*, Firenze, 9: 393-396.
- KURAMOTO, T. 1976: Resistance to Benomyl and Thiophanatemethyl in strains of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in Japan. *Plant Dis. Repr.*, 60: 168-172.
- SCHREIBER, L. R.; TOWNSEND, A. M., 1976: Naturally occurring tolerance in isolates of *Ceratocystis ulmi* to Methyl 2-benzimidazole-carbamate hydrochloride. *Phytopathology*, 66: 225-227.
- WUEST, P. J.; COLE, H.; SANDERS, P. L., 1973: Tolerance of *Verticillium dahliae* to benomyl. *Phytopathology*, 64: 331-334.

(Aceptado para su publicación: 31 mayo 1991)