

Variaciones en la sensibilidad de aislamientos de *Phoma tracheiphila* ("Mal secco" de los Cítricos) en Italia

I. GIMENEZ VERDU

Han sido realizadas en Italia una serie de pruebas "in vitro" con el fungicida sistémico benomilo incluido en el substrato a distintas concentraciones, con objeto de averiguar posibles variaciones en la sensibilidad de aislamiento de *Phoma tracheiphila* ("Mal secco" de los Cítricos), procedentes de cultivos de limonero tratados a distintas concentraciones del producto comercial Benlate durante 3 años consecutivos, y no tratados.

Como resultado se ha observado la existencia de cepas tolerantes incluso en los aislamientos recogidos en campos no tratados, si bien su frecuencia fue mayor en los tratados, en especial a la dosis más alta.

Estos resultados sugieren que aunque en algún caso el producto haya podido favorecer una mutagénesis, la tolerancia se deba más bien a que al ser progresivamente eliminadas las cepas sensibles artagónicas en los sucesivos tratamientos en campo, la consecuente disminución de competencia posiblemente acompañada de otras características como mayor capacidad de esporulación, patogenicidad, etc., de éstas, ha favorecido el aumento de las cepas tolerantes al benomilo.

Dicho aumento a su vez se ha visto favorecido por la velocidad de reproducción de estos microorganismos, lo que ha facilitado igualmente que se produzcan múltiples entrecruzamientos que en muchos casos hayan determinado recombinaciones incluso altamente tolerantes, a partir de los genes con tolerancia natural existentes en las cepas.

Conclusión especialmente apoyada por el hecho, de que las cepas procedentes de campos no tratados han experimentado únicamente la acción selectiva del producto "in vitro".

I. JIMENEZ VERDU: Dpto. de Biología Vegetal I. Universidad Complutense de Madrid.

Palabras clave: Recombinaciones tolerantes, genes con resistencia natural, frecuencia, cepas, umbral de tolerancia, crecimiento colonias.

INTRODUCCION

Como es sabido, los microorganismos tienen una gran variabilidad genética y rapidez de reproducción. La variabilidad genética de los hongos radica en su

capacidad de mutación, recombinación y segregación. Igual que en los organismos superiores, la sexualidad facilita su evolución ya que implica la recombinación de los caracteres hereditarios, como ocurre en los hongos perfectos. En los imperfectos,

al carecer de reproducción sexual, la variabilidad se produce mediante mecanismos genéticos especiales como son el sobrecruzamiento somático o la recombinación mitótica (parasexualidad).

Otras formas de sexualidad que en consecuencia también constituyen medios de adaptación a los cambios que se producen en la naturaleza y en consecuencia de evolución en los hongos, son la heterocariosis (JINKS, 1952) y la variación citoplásmica (JINKS, 1957, 1959).

Todas estas fuentes de variabilidad genética han contribuido a la formación de razas fisiológicas, determinadas por la ocurrencia dentro de las especies morfológicas, de individuos que difieren entre sí en uno o más caracteres, patogenicidad, propiedades bioquímicas, morfología sobre el huésped, etc. Un criterio importante de diferenciación entre razas es la especialización patogénica, al punto que usualmente se identifica con el carácter fisiológico de patogenicidad (HALISKY, 1965).

Los citados factores han evolucionado de forma diferente dentro de organismos tan distintos biológica y genéticamente como son huéspedes y patógenos, si bien todos han llegado a poderse definir por el concepto de gen-a-gen, que establece la complementariedad de los sistemas genéticos del huésped y del parásito según enunció FLOR (1942, 1955, 1956, 1971), estudiando ambos en la roya del lino (*Linum usitatissimum*) debida a *Melampsora lini*. Dicho autor señaló que la resistencia a la roya se hereda como un carácter dominante en varios loci del huésped y la virulencia es recesiva frente a la no virulencia en los correspondientes loci del patógeno. O sea que por cada gen que condiciona la resistencia en el huésped, existe un gen específico que condiciona la patogenicidad en el parásito.

Es decir, tanto la resistencia del huésped

como la patogenicidad del patógeno vienen determinadas genéticamente por varios genes. En el huésped existen genes específicos que determinan su resistencia o susceptibilidad, y que están relacionados con la existencia a su vez de otros tantos genes en el patógeno que controlan la patogenicidad (virulencia o avirulencia).

La existencia según FLOR de sistemas genéticos complementarios, fue clave en la evolución del estudio de la interacción huésped-parásito y en el de la epidemiología de una enfermedad en un cultivo. A partir del trabajo de FLOR, muchos son los autores que han señalado relaciones gen-a-gen en Patología, MOSEMAN en 1959 estudió el sistema cebada-mildiu, DAY en 1974 señaló una serie de interacciones incluyendo diversos patógenos y asimismo basándose en su estudio VANDERPLANK (1982) (Cuadro I), posteriormente MICHELMORE *et al.* (1984) describió la interacción *Bremia latucae-Latuca sativa*.

Una vez conceptualizada la relación huésped-parásito desde el punto de vista genético, intentamos visualizar lo que ocurre en la relación patógeno-biocida.

Se sabe que la selección natural de las poblaciones de un hongo en la naturaleza, es más difícil de evaluar que cuando se trata de una selección dirigida. La artificial o dirigida, como resulta de una práctica agrícola es más factible de llegar a conocer, así son múltiples los casos derivados del cambio de práctica agrícola, de la introducción de nuevos fungicidas o de variedades de cultivo resistente a una enfermedad.

Un ejemplo conocido es el referido por SHIPTON (1973) con *Ophiobolus (Gaeumannomyces) graminis* grave patógeno de la raíz de cereales, con el que observó que en condición de monocultivo disminuía la intensidad de la enfermedad, debido a que la densidad de inóculo en el suelo disminuye y la morfología de la hifa

Cuadro 1. Lista de interacciones gen-a-gen. (DAY, 1974 y VANDERPLANK, 1982).

Royas	<i>Linum-Melampsora lini</i> <i>Zea-Puccinia sorghi</i> <i>Triticum-Puccinia graminis tritici</i> <i>Triticum-Puccinia striiformis</i> <i>Triticum-Puccinia recondita</i> <i>Avena-Puccinia graminis avenae</i> <i>Helianthus-Puccinia helianthi</i> <i>Coffea-Hermileia vastatrix</i>
Carbones	<i>Triticum-Ustilago tritici</i> <i>Avena-Ustilago avenae</i> <i>Hordeum-Ustilago hordei</i>
Caries	<i>Triticum-Tilletia caries</i> <i>Triticum-Tilletia contraversa</i> <i>Triticum-Tilletia foetida</i>
Mildius	<i>Hordeum-Erysiphe graminis hordei</i> <i>Triticum-Erysiphe graminis tritici</i>
Otros Hongos	<i>Malus-Venturia inaequalis</i> <i>Solanum-Phytophthora infestans</i> <i>Lycopersicon-Cladosporium fulvum</i> <i>Solanum-Synchytrium endobioticum</i>
Nematodos	<i>Solanum-Heterodera rostochiensis</i>
Insectos	<i>Triticum-Mayetolia destructor</i>
Bacterias	<i>Gossypium-Xanthomonas malvacearum</i> <i>Leguminosae-Rhizobium</i>
Virus	<i>Lycopersicon-TMV</i> <i>Lycopersicon-moteado y marchitez</i> <i>Solanum-virus x de la patata</i>

en la rizosfera del cereal se modifica presentándose subsecuentemente una reducción de la patogenicidad. No obstante, ASHER (citado por BURNETT, 1975) demostró que los aislamientos procedentes de monocultivos de cebada eran más agresivos, en general, que los procedentes de trigo que hubieran crecido en condiciones similares. Este hecho parece tener su explicación en que al ser la cebada más resistente que el trigo, las cepas del hongo que han llegado a disponer de recombinaciones genéticas más competentes en el sentido de determinar una mayor agresividad, son capaces de infectar la cebada por lo que se aíslan con mayor frecuencia de ella, a pesar de que la práctica de monocultivo tiende a disminuir la patogenicidad del hongo.

Por otro lado hay que recordar, que el

aumento de recombinaciones genéticas tolerantes en la mayoría de los microorganismos está favorecida, como es el caso de los hongos patógenos, por disponer de una gran variabilidad genética y una rápida capacidad de reproducción.

La selección debida al uso de biocidas, es al parecer la más conocida ya que ha dado lugar a un gran aumento de cepas de hongos resistentes a fungicidas, especialmente a sistémicos y en particular al benomilo, compuesto de probada efectividad desde hace unas tres décadas pero que comenzó a mostrar fallos en el control de diversas alteraciones desde finales de los años 60.

Un caso típico es el citado por BOLLEN Y SCHOLTEN (1971) en experiencias con cepas de *Botrytis cinerea* procedentes de campos de ciclámenes pulverizados con benomilo a

concentración de 0,15 %. Dichos autores apreciaron un aislamiento altamente tolerante ya que soportaba "in vitro" concentraciones de 1.000 ppm., mientras que la cepa salvaje era sensible a 0,5 ppm., lo cual les hizo pensar si por su similitud estaría relacionada con los grupos de resistencia específicos existentes en Oomicetos y Mucorales, o bien que hubiera sido originada por una mutación, es decir por resistencia adquirida, si bien esta última sugerencia fue debatida por WUEST *et al.* en 1974, por considerarla poco fundamentada.

Por otra parte diversos autores han señalado que el factor tolerancia no es suficiente para la supervivencia de una cepa, ya que en la población de un parásito pueden desaparecer cepas tolerantes independientemente de ser tratada o no. Tal suceso lo atribuyen a que para sobrevivir una cepa resistente necesitaría disponer de otras peculiaridades, como capacidad reproductiva y patogénica, competente en relación con las cepas sensibles en convivencia (WUEST *et al.*, 1974), capacidad que según SCHREIBER Y TOWNSEND (1976) es menor, en ciertos casos observados, que el de las sensibles. Asimismo, BOLLEN Y SHOLTEN (1971) relacionan el factor tolerancia con la capacidad de virulencia y esporulación.

De igual modo estos y otros autores señalan que para ser significativa en campo la tolerancia a fungicidas, un aislamiento debe disponer de cierto nivel de resistencia combinada con otras características esenciales para la supervivencia como son agresividad y virulencia.

Siguiendo esta misma línea, WARREN *et al.* (1974) en el control de *Sclerotinia homoeocarpa* frente a compuestos benzimidazólicos, y LITRELL (1974) con *Cercospora arachidicola* frente al benomilo y compuestos relacionados, tratan de la capacidad de las razas tolerantes para

sobrevivir en áreas de control con razas sensibles.

Respecto a la variación de tolerancia en aislamientos de una misma especie, SCHREIBER Y TOWNSEND (1976) realizaron estudios con *Ceratocystis ulmi* procedente de regiones distantes frente a MBC-HCL, sugiriéndoles la amplia variación observada, la existencia de un gen múltiple para el control de este carácter. De igual modo evidenciaron que dicha variación tenía lugar dentro de una misma área e incluso localidad.

Por otra parte, la tolerancia a fungicidas que se puede evidenciar en áreas de control, parece estrechamente relacionada con la efectividad de los mismos en su aplicación durante años sucesivos. De esta forma se han llegado incluso a detectar cepas con altos niveles de tolerancia, debido en especial a que el suministro continuado de uno o varios compuesto, pero de igual principio activo, al eliminar las razas sensibles en competencia, favorece la reproducción y entrecruzamiento de las tolerantes y en consecuencia el que aumente el número de las recombinaciones genéticas más resistentes.

Según BOLLEN Y SCHOLTEN (1971), el que se aísle con mayor frecuencia la raza tolerante, no es porque ésta sea de gran virulencia, sino más bien porque el tratamiento extingue las razas sensibles antagónicas y, otros autores como GOLDBERG Y COLE (1973), citan la ineficacia de tratamientos con benomilo en campos de golf comercial en el control de *Sclerotinia homoeocarpa*, donde habían sido extinguidas igualmente las sensibles. KURAMOTO (1976) indica que el que los tratamientos incrementen el número de razas tolerantes se debe a la selectividad por las razas.

En cuanto a su modo de acción, es sabido que el benomilo actúa esencialmente al convertirse en su derivado tóxico

carbendazima. Parece ser que entre otros efectos dicho producto interfiere en algunos procesos de síntesis macromolecular.

Se ha sugerido, que el benomilo actúa inhibiendo primariamente la mitosis del siguiente modo: la carbendazima forma un complejo con las subunidades de los microtúbulos, impidiendo el ensamblaje normal de dichas subunidades dentro de las fibras del huso mitótico; es decir, inhibe la formación del huso (KAARS SIJPESTEIN (1982). GRIFFIN (1981) señala que el benomilo y otros derivados bencimidazólicos inhiben la síntesis de DNA, pero es probable que indirectamente.

Los Oomicetos y los mamíferos tienen tubulinas sensibles a la colchicina, que no se ligan al benomilo, por tanto, no son sensibles a este producto ni a los bencimidazoles en general. Por otro lado, la mitosis de las plantas es igualmente sensible a la colchicina, de ahí que sus tubulinas sean del mismo modo resistentes a estos compuestos. Como resultado se justifica la efectividad del benomilo como fungicida sistémico, hecho además favorecido por su baja fitotoxicidad.

Según DAVIDSE (1982), al impedir como hemos dicho los productos bencimidazólicos el ensamblaje de los microtúbulos, se interfieren un gran número de los procesos en que están implicados, como división celular y nuclear, migración celular y movimiento de los organulos. Los microtúbulos desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la forma y estructura celular; por tanto, la inhibición de su formación afecta también a la organización intracelular. La afinidad de la subunidad de los microtúbulos por un compuesto bencimidazólico particular es, probablemente, el factor más importante que determina la actividad en ciertos organismos. La gran especificidad en la interacción que se forma entre la tubulina y los bencimidazoles es no obstante,

vulnerable a una mutación que disminuya esta afinidad, esto daría lugar a una raza resistente.

El citado argumento y en conjunto posiblemente todos los anteriormente expuestos, constituyen quizá la causa, en opinión de muchos autores, de la mayoría de los fallos que durante estas décadas en que tanto se ha venido usando el benomilo han ocurrido.

Cabe recordar que la determinación de si se trata de resistencia natural o adquirida es difícil como dijimos al inicio, ya que además relativo a biocidas y entre otras particularidades se sabe poco sobre supervivencia potencial y patogenicidad de aislamientos fungicida-tolerantes en experiencias de campo (MACKENZIE *et al.* 1971; SCHROEDER Y PROVIDENTI, 1969). BOLLEN Y SCHOLTEN en 1971 indicaron ya que la mayoría de los hongos patógenos son sensibles al benomilo aunque se conozcan casos de resistencia, si bien muy pocos de resistencia adquirida.

Ejemplos de tolerancia adquirida experimentalmente por radiación ultravioleta citaron entre otros autores BEN-YEPET *et al.* (1974) desarrollando mutaciones benomilo-tolerantes con *Ustilago hordei*. Otros mutantes genéticamente caracterizados han sido conseguidos por NAKAMURA Y SAKURAI, 1962; SCHROEDER Y PROVVIDENTI, 1969; en DEKKER, 1972.

Otro aspecto a considerar en los hongos, es la capacidad de adaptación que presentan a los cambios que se producen en la naturaleza, que si bien es poco conocida, es sin duda heredable. Por otra parte, la tolerancia no reduce la capacidad de competición del hongo como podría ser el caso, si se encontrase en un campo no tratado, ya que se ha podido observar que se han llegado a establecer razas tolerantes dispersadas por cualquier agente, como el viento. Ahora bien, al parecer en el campo, la tolerancia reduce de alguna forma la

capacidad de reproducción por lo que están en desventaja con las razas sensibles.

En ocasiones se han observado casos de adaptación tales como el sucesivo desarrollo de nuevas razas de un hongo, capaces de infectar sucesivos cultivos de plantas cruzadas entre sí para conseguir una variedad resistente al patógeno.

Por último, otro factor que cabe recordar, son los cambios en la virulencia de los patógenos, como citado por BAILEY (1950) con *Cladosporium fulvum* agente del moho de la hoja de la tomatera. DAY (1957) da un origen mutacional a la secuencia de cambios, al inducir por rayos X el cambio de un gen no virulento en su alelo virulento.

Las variaciones presentadas por las cepas como respuesta al suministro de biocidas motivó este trabajo, basado en el estudio "in vitro" del comportamiento frente al benomilo de aislamientos de *Phoma tracheiphila*, causante del "mal secco" de los Cítricos, procedentes de cultivos de limonero tratados con este mismo compuesto y no tratados,

Las plantaciones muestreadas tratadas lo habían sido durante 3 años consecutivos con el producto comercial Benlate (polvo soluble con el 50% de principio activo, benomilo) al 0,05 y 0,1% siendo 2 plantaciones distantes, A,B las que recibieron esta última concentración. También se muestrearon cultivos no tratados: C.

Como hemos dicho, el objetivo era averiguar la influencia que los sucesivos períodos de tratamiento podrían haber ocasionado sobre la sensibilidad de las poblaciones del patógeno, lo cual se evidenciaría comparando el comportamiento "in vitro" de estas cepas con el de las provenientes de campos no tratados, considerando asimismo la dosis recibida en campo, por si se apreciaban variaciones en la sensibilidad al respecto.

No hay que olvidar, que desde el punto de vista práctico la detección de tolerancia en cepas de una especie, constituye un importante dato en la elaboración del necesario calendario de tratamientos en campo, el cual permite establecer la frecuencia de aplicación época especialmente relacionada con los períodos de infección y conveniencia de alternar el suministro de un producto con otro de distinto principio activo, con objeto de evitar la aparición de fenómenos de tolerancia y adaptación.

Asimismo, sería conveniente, dado que a los cultivos infectados por graves patógenos se les suministran productos de alto coste, encontrar soluciones como cambiar de principio activo, evitar productos que por disponer de baja especificidad en su modo de acción den lugar a la aparición de fenómenos de resistencia cruzada, etc., evitándose así además tratamientos inefectivos.

Este trabajo fue realizado en Italia, por el interés que representa el estudio del "Mal secco" en la prevención de nuestros cítricos.

MATERIAL Y METODOS

A partir de los cultivos puros del patógeno, en total 80, obtenidos a partir de los aislamientos procedentes de las muestras recogidas respectivamente en cultivos tratados y no tratados, se sembraron placas Petri de 90 mm. de diámetro con 15 ml de substrato de agar-patata-sacarosa a pH. variable entre 5,6-5,9 posteriormente adicionado de benomilo a diversas concentraciones, para luego confrontar periódicamente el crecimiento de las colonias de una y otra procedencia.

Las placas eran sembradas con discos de 5 mm. de diámetro procedente del margen de colonias de 10-12 días de edad. La solución del compuesto era añadida al substrato y uniformada antes de vertir éste en placa.

El diámetro medio de las colonias relativas a cada concentración de producto "in vitro" y dosis aplicada en campo, es decir de cada experiencia, correspondió a un número de lecturas: n° de cepas utilizadas por n° de repeticiones de cada una, dividido por el n° total de lecturas por experiencia.

El diámetro medio se refirió solamente a los aislamientos que presentaron crecimiento.

Las medidas del diámetro medio y n° de colonias crecidas se realizaba periódicamente al cabo de : 3-7-14-21 días de la siembra, es decir, a partir del tercer día, semanalmente.

Se valoró especialmente la tercera toma de medidas, por considerar que se habría estabilizado ya el crecimiento de las colonias, ya que el producto incluido en el sustrato además de inhibir su crecimiento, lo enlentecía.

La reducción media de crecimiento de las cepas de cada dosis suministrada en campo y concentración de productos "in vitro", estaba referida a la correspondiente media de crecimiento a 0 µg/ml de benomilo incluido en el sustrato.

RESULTADOS

Pruebas preliminares:

Las concentraciones usadas fueron establecidas dentro de un amplio intervalo, de forma que quedase incluida la dosis de inhibición total, siendo, por tanto, de: 0-1-10-1-00-1.000 µg/ml y permitieran observar el comportamiento de las colonias a las concentraciones intermedias.

Se utilizaron cepas de campos tratados a la mayor concentración y de no tratados.

El n° de colonias crecidas y su diámetro medio fueron medidos, en las 3 primeras medidas cada 48 horas, y a partir de la tercera a intervalos crecientes de tiempo.

Resultados:

A 1 µg/ml no se produjo inhibición aparente.

A 10 µg/ml se produjo una fuerte inhibición, ya que creció un reducido número de colonias que presentaban una fuerte reducción del diámetro de crecimiento. El mayor número de placas mostraba el círculo inicial de micelio transferido destruido, a excepción de un bajo número de placas en las que se observaba que dicho círculo había soportado la dosis, si bien no mostraba crecimiento.

A 100 µg/ml la inhibición fue del 100%.

Prueba I:

Tenía por finalidad comparar la sensibilidad de las cepas de los cultivos, en especial las de tratados con las de no tratados, para precisar las observaciones facilitadas por las pruebas preliminares. Las concentraciones usadas fueron: 0-1-10-100 µg/ml. Los aislamientos provenían de:

A,B: Campos tratados al 0,10% de Benlate, durante 3 años consecutivos.

C: Campos tratados al 0,05% de Benlate, durante 3 años consecutivos.

D: Campos no tratados.

Se ensayaron, por tanto, cepas de 4 localidades; 3 de campos tratados y 1 de campos no tratados, a 4 concentraciones de producto. Total 16 experiencias.

Se utilizaron 5 cepas de los aislamientos de cada origen, efectuándose 4 placas por cada una de ellas, en total 20 placas por experiencia.

Resultados: Cuadro 2

A 1 µg/ml no se observó inhibición aparente, ya que la media de crecimiento de las colonias de cada experiencia era igual a la que presentaban respectivamente a 0 µg/ml.

A 10 µg/ml no se dio por el contrario una fuerte inhibición. La reducción del número de colonias que habían crecido, osciló entre el 70 y el 90%:

De campos tratados a la dosis de 0,1% de Benlate, dicha reducción osciló entre el 70 y el 74%

De campos tratados a la dosis de 0,05 de Benlate, la reducción del número de colonias fue del 80%

De campos no tratados la reducción del número de colonias fue del 90%.

Por otra parte, el crecimiento que presentaban las colonias crecidas fue muy limitado. La reducción media de crecimiento para las colonias de cepas provenientes de campos tratados al 0,1% de Benlate fue del 76% respecto a la media de crecimiento que dichas colonias presentaban a 0 µg/ml. De aproximadamente el 81,6% para las colonias procedentes de campos tratados a 0,05% de Benlate, y del 82% para las procedentes de campos no tratados.

Aparte de estas placas cuyas colonias presentaban crecimiento, en un pequeño número de placas se observó que el círculo de micelio inicialmente transferido, si bien no había crecido, había soportado la dosis. De las restantes placas, que constituían el mayor número, el círculo de micelio transferido había sido destruido.

A 100 µg/ml la inhibición fue del 100%.

Como resumen de las pruebas preliminares y de ésta primera prueba, se pudo apreciar que los aislamientos procedentes de campos tratados presentaban el mayor porcentaje de colonias crecidas y el mayor diámetro. Además se confirmó como concentración crítica la de 10 µg/ml, y de inhibición total la de 100 µg/ml.

Prueba II:

Se intentó averiguar la inhibición en el entorno de la concentración de 10 µg/ml y, si a concentraciones inferiores a la de 100 µg/ml se daba inhibición total, comparando tanto a una concentración como a otra el comportamiento de los aislamientos en relación a las diferentes dosis suministradas en campo.

Las concentraciones establecidas en consecuencia fueron: 0-1,25-2,50-5,00-10,00-20,00-40,00-80,00 µg/ml.

Los aislamientos utilizados fueron de los 4 mismos orígenes que en las pruebas anteriores y se ensayaron a 8 concentraciones diferentes, determinándose en total 32 experiencias. De cada origen se utilizaron 5 cepas, realizándose 3 placas de repetición por cada una de ellas.

Resultados: Cuadro 3, Fig. 1, 2 y 3.

A las concentraciones de 1,25 y 2,50 µg/ml, no se apreció reducción ni en el diámetro medio ni en el número de colonias, en las medidas de control efectuadas en la tercera semana.

A 5 µg/ml, la reducción del diámetro de crecimiento de las colonias fue del 42% para las colonias de cepas procedentes de las plantaciones tratadas al 0,1% de Benlate, y del 51% para las colonias de cepas provenientes de campos tratados al 0,05% es decir, mayor. Para las colonias procedentes de cultivos no tratados, la reducción fue del 67%, medida que superaba las citadas.

A esta concentración sólo las colonias provenientes de cultivos no tratados presentaron una reducción en el nº de colonias que crecieron, que fue del 10%.

A 10 µg/ml se dio una fuerte reducción en el número de colonias crecidas, que osciló entre el 55 y el 58% para las cepas provenientes de plantas tratadas en campo a 0,1%, y del 74% para las procedentes de plantaciones tratadas al 0,05%, y del 93% para las colonias procedentes de campos no tratados. Así pues, se observaba mayor tolerancia en los aislamientos procedentes de campos tratados y a la mayor dosis.

Asimismo, la reducción del diámetro de las colonias respecto al que presentaban los aislamientos de cada origen a la concentración "in vitro" de 0 µg/ml fue:

Para las colonias procedentes de campos tratados al 0,1% de Benlate, del 75%.

Cuadro 2.- Comportamiento de cepas de *P. tracheiphila*, provenientes de campos tratados con Benlate durante tres años consecutivos y de campos no tratados, frente a diversas concentraciones de benomilo

Origen de las muestras	Concentraciones de Benlate (%) en los tratamientos en campo.	Medidas de las colonias al cabo de:															
		7 días				14 días				21 días							
		Concentraciones de benomilo (µg/ml) en el sustrato		Concentraciones de benomilo (µg/ml) en el sustrato		Concentraciones de benomilo (µg/ml) en el sustrato		Concentraciones de benomilo (µg/ml) en el sustrato		Concentraciones de benomilo (µg/ml) en el sustrato		Concentraciones de benomilo (µg/ml) en el sustrato					
		0	1	10	100	0	1	10	100	0	1	10	100	0	1	10	100
Plantas tratadas																	
A	0,10 (mm) (%)	40,1 (100)	43,7 (100)	8,0 (25)	0,0 (0)	68,6 (100)	73,8 (100)	12,6 (30)	0,0 (0)	72,5 (100)	74,9 (100)	19,0 (30)	0,0 (0)				
B	0,10 (mm) (%)	46,2 (100)	42,1 (100)	8,4 (25)	0,0 (0)	71,0 (100)	66,5 (100)	13,0 (25)	0,0 (0)	76,3 (100)	69,3 (100)	18,3 (26)	0,0 (0)				
C	0,05 (mm) (%)	49,2 (100)	49,3 (100)	8,0 (10)	0,0 (0)	73,2 (100)	73,1 (100)	11,2 (20)	0,0 (0)	76,0 (100)	74,1 (100)	14,2 (20)	0,0 (0)				
Plantas no tratadas : D	— (mm) (%)	47,1 (100)	49,1 (100)	6,0 (5)	0,0 (0)	63,7 (100)	73,1 (100)	9,5 (10)	0,0 (0)	72,5 (100)	75,6 (100)	13,0 (10)	0,0 (0)				

(a).- Cada dato es la media de los diámetros de las colonias que han crecido.

(b).- Para cada experiencia (16 en total) se han utilizado 5 cepas, realizándose cuatro repeticiones por cada una (total 20 repeticiones por experiencia).

Para la provenientes de campos al 0,05%, del 82%.

Para las provenientes de campos no tratados, del 86,5%.

Es decir, tanto en el porcentaje de colonias crecidas como en el de media de crecimiento, se confirma la proporcionalidad con la dosis de tratamiento en campo.

A 20, 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$, la inhibición fue del 100%.

Resumen:

La concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ demostró ser la concentración más cercana a la de 10 $\mu\text{g/ml}$ que presentaba ya una inhibición significativa en el crecimiento de las procedentes de campos no tratados.

La dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$, quedó definitivamente establecida como concentración diferencial de la tolerancia al benomilo.

A partir de 20 $\mu\text{g/ml}$, la inhibición fue total.

Prueba III:

Tenía por finalidad concretar con mayor exactitud el comportamiento de las colonias a la concentración crítica de 10 $\mu\text{g/ml}$, para precisar la tolerancia observada e intentar así, deducir el efecto de los tratamientos en campos sobre la sensibilidad de las cepas de *Ph. tracheiphila*. Se utilizan cepas tratadas al 0,1% de Benlate y cepas de campo no tratados, efectuándose 100 placas de repetición para cada una de las 2 experiencias. Las medidas se efectuaron a los 9-18-26 días.

Resultados: Cuadro 4 a, b).

Los resultados que se dan en el cuadro 8b, fueron obtenidos mediante un tratamiento estadístico utilizando el método de randomización completa.

Crecieron el 23% de las colonias del total de placas sembradas, si bien un bajo número de éstas aunque soportó la dosis de fungicida, no creció. Como en las pruebas anteriores, la mayoría de las placas

presentaba el círculo de micelio inicialmente transferido, destruido.

El número de colonias crecidas provenientes de campos tratados fue del 35% siendo el de las provenientes de campos no tratados del 11%, es decir menor.

El diámetro medio de crecimiento de colonias crecidas procedentes de campos tratados fue de 8,28 mm. y el de las procedentes de campos no tratados, de 3,7 mm. igualmente menor.

Prueba IV:

Tenía por finalidad averiguar cuándo el producto había actuado como fungicida y cuándo como fungistático.

Con este fin se usaron las cepas que durante 12 días de permanencia en placa con el substrato adicionado de benomilo a la concentración de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$, no habían presentado crecimiento, efectuándose siembra a partir de dichas cepas en placas con substrato no adicionado de benomilo.

Se utilizaron 3 cepas de aislamientos procedentes de campos tratados al 0,1 % de Benlate y 3 de no tratados. De cada cepa se realizaron 10 placas de repetición, obteniéndose un total de 30 placas para los aislamientos de cada procedencia. Periódicamente se midió el número de colonias crecidas y su diámetro medio.

Resultados: Cuadro 5.

Las placas sembradas con material proveniente de placas con el substrato adicionado de benomilo a concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, mostraron crecimiento en el 60% de los aislamientos procedentes de plantaciones tratadas, y en el 45% de los relativos a cultivos no tratados, a los 20 días.

El diámetro medio de las colonias provenientes de campos tratados fue de 70 mm., siendo de 48 mm. el presentado por las colonias crecidas procedentes de no tratados.

En cuanto al material transferido a partir de las placas en cuyo substrato el benomilo había sido incluido a con-

Cuadro 3.- Comportamiento de cepas de *P. tracheiphila*, provenientes de campos tratados con Benlate durante tres años consecutivos y de campos no tratados, frente a diversas concentraciones de benomilo

Origen de las muestras	Concentraciones de Benlate (%) en los tratamientos en campo.	Medidas de las colonias al cabo de:											
		7 días						21 días					
		0	1,25	2,5	5	10	20	0	1,25	2,5	5	10	20
Concentraciones de benomilo (µg/ml) en el substrato													
A	0,10	(mm) 41,5 (%) (100)	42,2 (100)	33,5 (100)	19,0 (80)	9,8 (11,5)	0,0 (0,0)	73,5 (100)	78,4 (100)	75,0 (100)	44,6 (100)	18,8 (42,2)	0,0 (0,0)
B	0,10	(mm) 42,2 (%) (100)	42,8 (100)	36,2 (100)	18,2 (76,0)	10,4 (12,6)	0,0 (0,0)	77,2 (100)	75,0 (100)	74,3 (100)	42,5 (100)	20,0 (45,0)	0,0 (0,0)
C	8,05	(mm) 44,3 (%) (100)	43,0 (100)	32,0 (100)	13,8 (60,0)	7,5 (6,6)	0,0 (0,0)	77,4 (100)	74,0 (100)	73,3 (100)	38,0 (100)	13,9 (26,0)	0,0 (0,0)
Plantas no tratadas	---	(mm) 43,4 (%) (100)	44,1 (100)	31,6 (94,0)	8,3 (45,0)	5,4 (2,5)	0,0 (0,0)	75,5 (100)	76,0 (100)	67,8 (100)	25,0 (90,0)	10,5 (7,0)	0,0 (0,0)

(a) - Cada dato es la media de los diámetros de la colonias que han crecido.

(b) - Para cada experiencia (32 en total), se han utilizado 5 cepas, realizándose 3 repeticiones por cada una (total 15 repeticiones por experiencia).

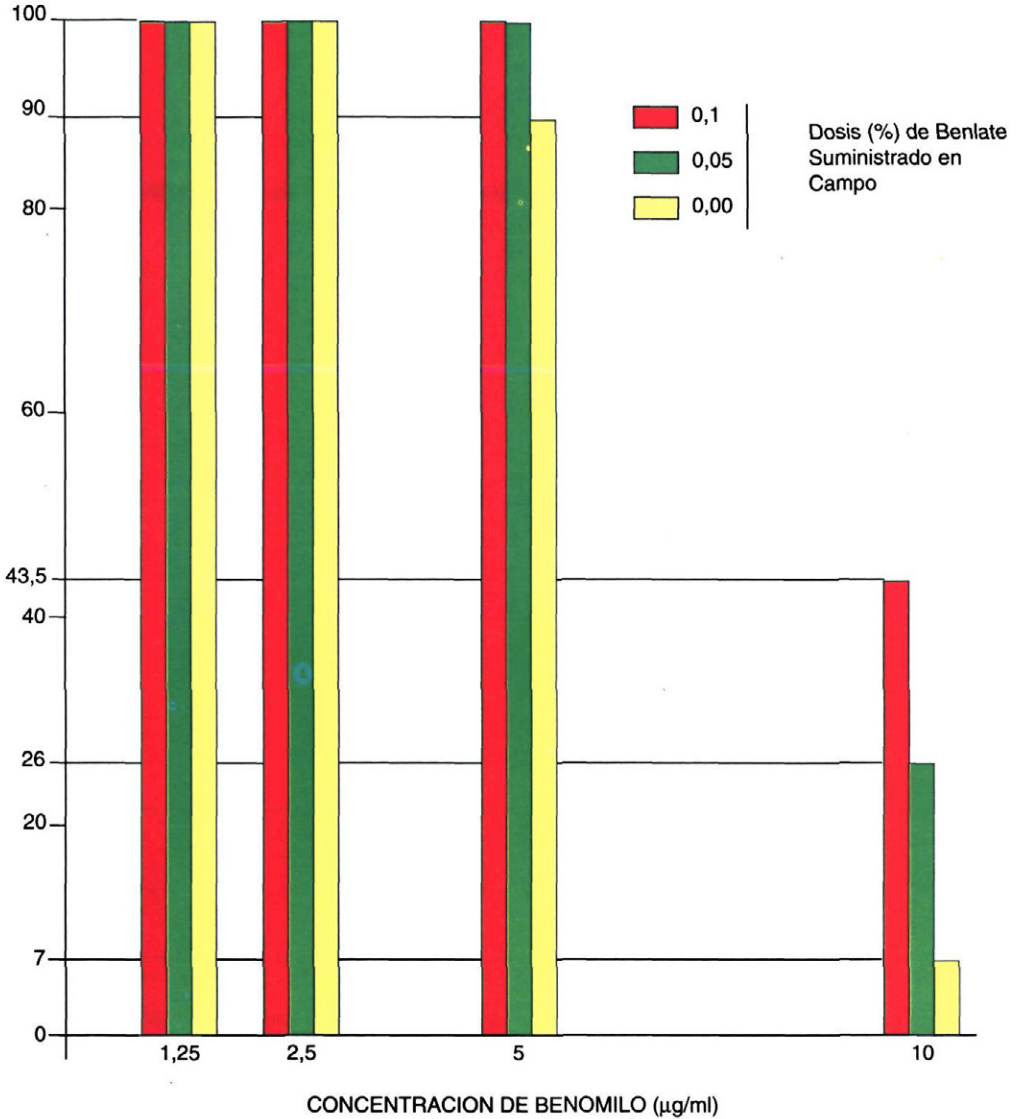


Fig. 1.- Distribución de los aislamientos de *P. tracheiphila* tolerantes al benomilo en relación a la mínima concentración de inhibición

centración de 100 µg/ml, no se observó crecimiento.

DISCUSION

Se ha intentado dilucidar la acción del

benomilo sobre poblaciones de *P. tracheiphila* que habían sido sometidas durante 3 años, a tratamientos en campo a dosis de Benlate de 0,1 y 0,05%, respectivamente.

Con este objetivo se realizaron una serie de

Cuadro 4. a - Inhibición del crecimiento de aislamientos de *P. tracheiphila* provenientes de campos tratados y no tratados sobre PDA adicionando con 10 µg/ml de benomilo.

Origen de las muestras	Diámetro medio (mm) y porcentaje de las colonias crecidas al cabo de los días:																				% de colonias crecidas
	9 días									26 días											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Plantas tratadas (mm)	5,1	0,0	0,0	4,4	0,0	1,4	1,2	3,0	0,0	2,6	7,4	6,8	5,6	10,3	2,8	12,6	4,2	14,4	5,6	8,4	
Benlate al 0,1 % (%)	2,0	—	—	1,0	—	0,5	0,5	2,5	—	0,5	2,0	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0	4,0	1,5	0,0	16
Plantas no tratadas (mm)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	1,8	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	11,6	6,0	0,8	
Plantas no tratadas (%)	—	—	—	—	—	—	—	0,5	—	—	1,0	—	1,0	—	—	—	—	1,5	1,5	0,5	5,5

(1). - Se utilizaron 10 cepas de los aislamientos de cada procedencia, realizándose 10 placas de repetición por cada una.

Cuadro 4.b - Inhibición del crecimiento de aislamiento de *P. tracheiphila* provenientes de campos tratados y no tratados, sobre PDA a concentración de 10 µg/ml de benomilo.

Origen de las muestras	Diámetro medio (mm) y porcentajes de las colonias crecidas al cabo de:			
	9 días	18 días	26 días	días
Plantas tratadas con Benlate al 0,1%	9,3 (11,5%)	13,2 (35,0%)	17,8 (39,1%)	
Plantas no tratadas	7,0 (1,0%)	9,6 (4,9%)	11,5 (7,0%)	

(a). - Cada dato es la media de los diámetros de las colonias que han crecido.

(b). - Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes de las colonias crecidas.

(c). - Las diferencias entre los diámetros medios de crecimiento y porcentaje de colonias crecidas de cepas provenientes de campos tratados y no tratados han sido en cada toma de medidas, estadísticamente significativas para $P=0,01$.

(d). - De los aislamientos de cada origen, se efectuaron 100 placas de repetición.

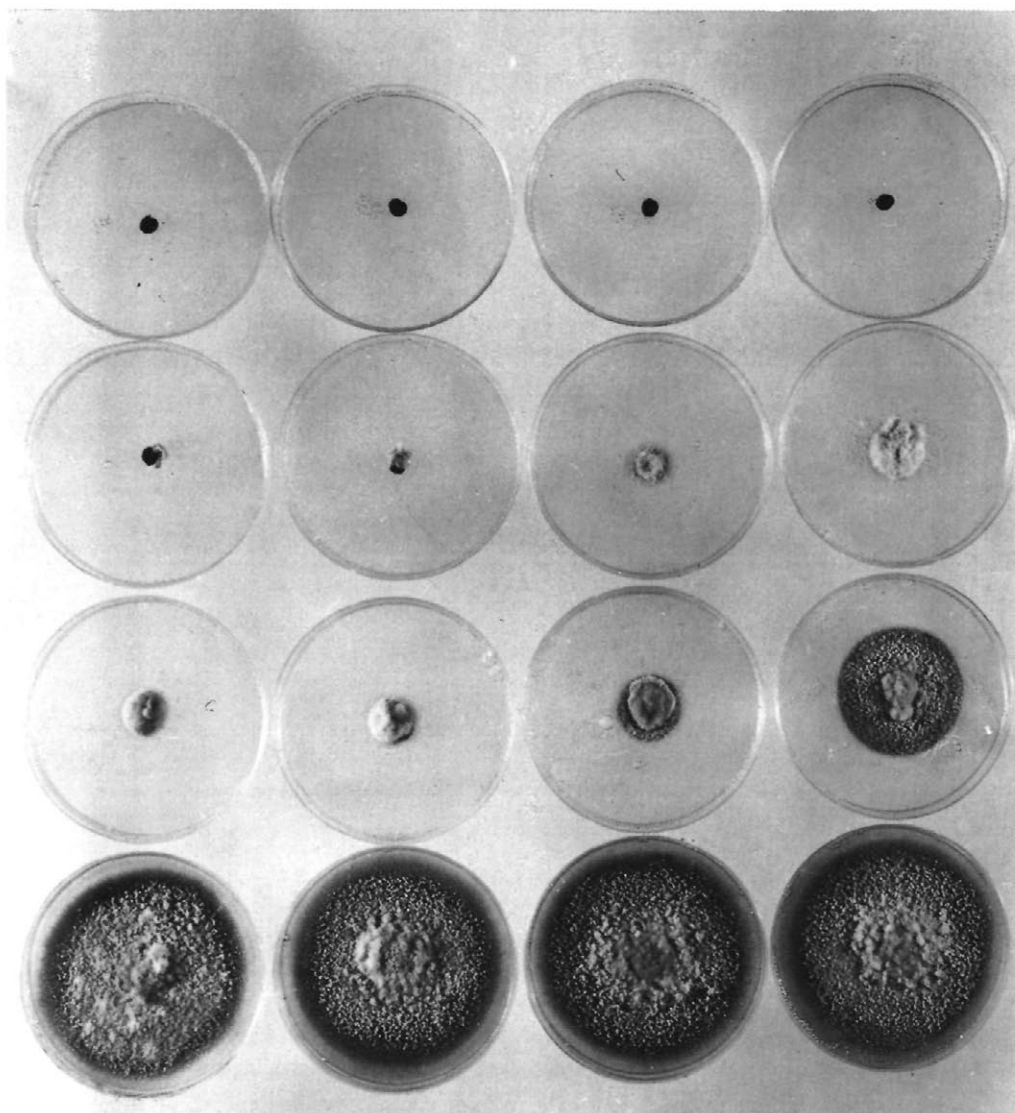


Fig. 2.- Acción fungitóxica ejercida por el benomilo frente a *P. tracheiphila*: d) Testigos crecidos sobre PDA no adicionado de producto. c) , b) y a) Colonias crecidas sobre PDA adicionado con benomilo, respectivamente a concentraciones de 5-10 y 20 µg/ml..

pruebas "in vitro" en que el sustrato era adicionado con diversas concentraciones de benomilo, comparándose el comportamiento de los aislamientos procedentes de campos tratados con los de no tratados. Asimismo se ha pretendido averiguar si la diferencia entre las dosis aplicadas en campo, se

reflejaba en la respuesta de sensibilidad de las cepas.

De las concentraciones utilizadas "in vitro", a 5 µg/ml ya se observó una reducción en el diámetro de crecimiento de las colonias, que fue mayor para las procedentes de campos no tratados.

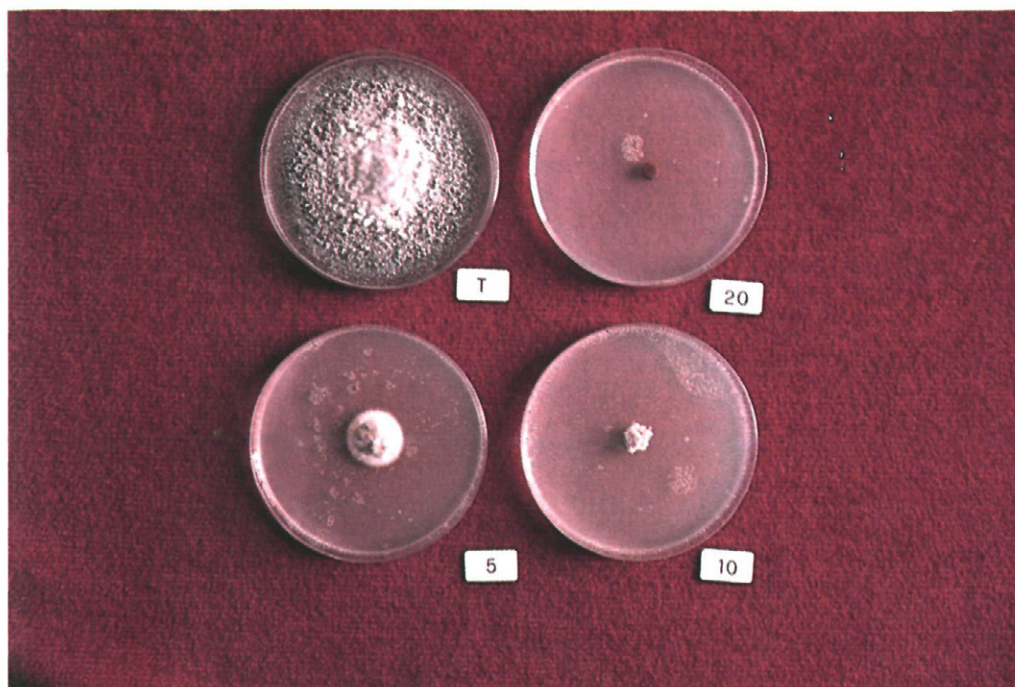


Fig. 3.- Aspecto particular, en color, de un aislamiento de *Phoma tracheiphila*, sembrado en placa con el sustrato adicionado de benomilo respectivamente a las concentraciones de 0-5-10-20 $\mu\text{g/ml}$. Se considera como testigo la colonia crecida a 0 $\mu\text{g/ml}$ de producto.

Asimismo hubo reducción en el número de colonias pero únicamente en las procedentes de campos no tratados, lo que concuerda con que es la primera vez que éstas experimentan la acción selectiva del producto.

La concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ se consideró crítica en cuanto que permitió diferenciar el comportamiento de las colonias en orden a su sensibilidad o resistencia al benomilo. Las colonias que presentaron crecimiento a esta dosis se consideraron tolerantes; las que no crecieron pero soportaron la dosis, se dedujo que era la máxima que podían soportar, constituyendo su "umbral de tolerancia". Por último, las placas en que el círculo de micelio transferido inicialmente parecía destruido, se consideraron sensibles.

Así pues, a partir de los resultados obtenidos en las diversas pruebas se ha podido observar que:

Existen cepas tolerantes tanto en campos tratados como no tratados, lo que hace suponer la existencia de una tolerancia natural en ellos, hecho que concuerda con los estudios realizados por HARDIN (1972), WUEST *et al.* (1974), SCHREIBER Y TOWNSEND (1976), entre otros autores.

La frecuencia de la presencia de cepas tolerantes resultó ser de 4 a 6 veces mayor en las aisladas de campos tratados, lo que permitió concluir que el efecto del fungicida incidió en eliminar las cepas sensibles antagónicas del hongo, por lo que sucesivamente crece el número de cepas que presentan baja sensibilidad de benomilo.

Esta acción selectiva está de acuerdo con

Cuadro 5 - Diámetro de las colonias (mm) y número (%) de cepas de *P. trachiphila* que presentaron crecimientos sobre PDA. Para efectuar las siembras se han utilizado fragmentos de los discos de colonia que después de 12 días no habían crecido sobre PDA adicionado con benomilo, a 10 y 100 µg/ml.

	Medida de las colonias al cabo de:		
	10 días	100 días	20 días
Origen de las muestras	10	100	10
	Concentraciones de benomilo que habían impedido el crecimiento de las colonias.		Concentraciones de benomilo que habían impedido el crecimiento de las colonias.
Plantas tratadas con Benlate al 0,1 %	26 (mm)	0	70
	43 (%)	0	60
Plantas no tratadas	15 (mm)	0	48
	26 (%)	0	45
		100	100

las observaciones realizadas por BOLLEN Y SHOLTEN (1971), GOLDBER Y COLE (1973), KURAMOTO(1976).

De igual forma, el fenómeno de acción selectiva del producto sobre las cepas procedentes de cultivos no tratados, tuvo lugar a través de las pruebas "in vitro" efectuadas, ya que a partir de éstas se obtuvo la mayor reducción en el número de colonias crecidas y en su diámetro de crecimiento.

Cabe considerar asimismo, que los sucesivos tratamientos en campo a la vez que van eliminando las cepas sensibles enlentecen su crecimiento, disminuyendo así la rapidez de reproducción de éstas debido a la presencia continuada del benomilo. Todo esto parece sugerir, que existe una interferencia en algún control del ciclo celular de la mitosis. Estos razonamientos concuerdan con los resultados obtenidos en la última prueba, en la que se observaba que el producto actuaba más veces como fungistático que como fungicida sobre las cepas sensibles aisladas de campos tratados, lo que reafirma la acción selectiva de benomilo en estos campos.

Inversamente ocurre con las cepas tolerantes, las cuales en las poblaciones de los campos tratados cada vez existirán en mayor número, ya que al ser, como hemos dicho, eliminadas progresivamente las sensibles en competencia, viene favorecida su reproducción y con ello el aumento de su

número y el de las recombinaciones que determinan cepas con alta tolerancia. Estas consideraciones están en concordancia con los resultados obtenidos en las pruebas "in vitro", en las que se observó que presentaban mayor número de colonias crecidas y diámetro de crecimiento generalmente las cepas de campos tratados especialmente a la mayor dosis de Benlate de 0,1%, debido a ser la acción selectiva más potente a esta dosis.

En conclusión, el hecho de que existan cepas tolerantes al benomilo en las poblaciones de *Ph. tracheiphila*, puede significar la futura ineficacia de eventuales tratamientos con fungicidas becimidazólicos. Por otra parte cabe considerar, si bien como posibilidad difícil de verificarse, que el benomilo u otro fungicida becimidazólico podría frenar el desarrollo de las poblaciones de hongos saprófitos antagonistas efectivos del patógeno causante del "Mal secco" agravando la enfermedad, al disminuir la competencia con las cepas tolerantes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Insto. de "Patología Vegetale" de la Fac. de "Agraria", de la Univ. de Bari (Italia). No olvido en mi agradecimiento las enseñanzas recibidas del Prof. N. LUISI.

ABSTRACT.

I. GIMÉNEZ VERDU: Departamento de Biología Vegetal I. Universidad Complutense. Madrid. Variaciones en la sensibilidad de aislamientos de *Phoma tracheiphila* ("Mal secco" de Cítricos) en Italia. *Bol. San. Veg. Plagas*, **17** (4) :477-496.

A series of "in vitro" tests have been done in Italy using the systemic fungicide benomilo added at different concentrations to the substrate. The purpose of these experiments has been to elucidate possible variations in the isolation sensibility of *Phoma tracheiphila* ("Mal secco" of *Citrus trees*) from lemon trees fields in Italy

(Italia) treated with different concentrations of the commercial product Benlate during 3 consecutive years, and also non treated plants.

As a result we have observed the occurrence of the tolerant strains even in no treated fields, although their frequency was higher in the treated ones, specially in higher doses.

These results suggest that although in some cases the used product could favour mutagenesis, the tolerance seems to be due to the elimination of the antagonistic strains during the successive field treatments.

This competition decrease could be followed by an increased sporulation capacity, pathogenicity, etc., facts which favour the increase of the strains benomyl resistant.

These increase could be also favoured by the reproduction rate of these organisms, which facilitates the occurrence of multiple crosses originating, in some cases, recombinants high tolerant strains from the tolerance genes already present in the natural strains, conclusion which seems to be reinforced by the fact that the strains isolated from non treated fields have only suffered the "in vitro" selective action of the product.

Key words: *Phoma tracheiphila*, "Mal secco", citrus trees, tolerant strains, benomyl, Italy.

REFERENCIAS

- BAILEY D.L. (1950). *Canad. J. Res.* **C28**: 535-565-
- BEN-YEPHET Y., HENIS Y., DINOOR A. (1974). Genetic studies on tolerance of carboxin and benomyl at the asexual phase of *Ustilago hordei*. *Phytopathol.*, **64**: 51-56.
- BOLLENG G. J., SCHOLTEN G. (1971). Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Neth. J. Pl. Path.*, **77**: 83-90.
- BURNETT J.H. (1975). *Mycogenetics. An introduction to the general genetics of fungi*. edit. John Wiley & Sons: 375 pp.
- DAVIDSE L.C. (1982). In: *Fungicide resistance in crop protection*. (eds.: Dekker J. & Georgopoulos S.G.): 265 pp.
- DAY P.R. (1975). Mutation to virulence in *CLADOSPORIUM FULVUM*. *NATURE*, **179**: 1141-1142.
- DAY P.R. (1974). *Genetics of host-parasite interactions*. San Francisco W.H. Freeman & Co.
- DEKKER J. (1972). In: *Systemic Fungicides* (ed. R.W. Marsh): 156-174, Longman, London.
- FLOR H.H. (1972 a). Inheritance of pathogenicity in a cross between physiologic races 22 and 24 of *Melampsora lini*. *Phytopathology*, **32**: 5.
- FLOR H. H. (1942 b). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, **32**: 653-669.
- FLOR H.H. (1955). Host-parasite interaction in flax-rust-its genetics and other implications. *Phytopathology*, **45**: 680-685.
- FLOR H.H. (1956). The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.*, **8**: 29-54.
- FLOR H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **9**: 275-296.
- GOLDBERG A., COEL H. (1973). "In vitro" study of Benomyl tolerance exhibited by *Sclerotinia homoeocarpa*. *Phytopathology*, **63**: 201-202.
- GRIFFIN D.H. (1981). *Fungal Physiology*. Edit. John Wiley & Sons, New York.
- HALISKY P.M. (1965). Physiologic specialization and genetics of the smut fungi. III. *Bot. Rev.*, **31**: 114-150.
- JINKS J.L. (1952). Heterokaryosis:: a system of adaptation in wild fungi. *Proc. Roy. Soc. (London), Series B*, **140**: 83-99.
- JINKS J.L. (1957). Selection for cytoplasmic differences. *Proc. Royal Soc. (London), Series B*, **146**: 527.
- JINKS J.L. (1959). Selection for adaptability to new environments in *Aspergillus glaucus* J. *Gen. Microbiol.*, **20**:223.
- KAARS SJPESTEIN A. (1982). In: *Fungicide resistance in crop protection*. Eds.: Dekker J. & Georgopoulos S.G.: 265 p.
- LITRELL R.H. (1974). Tolerance of *Cercospora arachidicola* to benomyl and related fungicides. *Phytopathol.*, **64**: 1377-1378.
- MACKENZIE D.R., COLE H. JR., NELSON R.R. (1971). Qualitative inheritance of fungicide tolerance in a natural population of *Cochliobolus carbonum*. *Phytopathol.*, **61**: 458-462.
- MICHELMORE R.W., NORWOOD J.M., INGRAM D.S. CRUTE I.R., NICHOLSON P. (1984). The inheritance of virulence in *Bremia lactucae* to match resistance factors 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11 in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant pathology*, **33**: 301-315.
- MOSEMAN J.G. (1959). Host-pathogen interaction of the genes for resistance in *Hordeum vulgare* and for

- pathogenicity in *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Phytopathology*, **49**: 469-472.
- NAKAMURA H., SAKURAI L. (1962). *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **27**: 84 (Abstr.)
- SCHREIBER L.R., TOWNSEND A.M. (1976). Naturally occurring tolerance in isolates of *Ceratocystis ulmi* to Metryl 2- benzimidazol-carbamate hydroxide. *Phytopathology*, **66**: 225-227.
- SCHROEDER N.T., PROVVIDENTI R. (1969). Resistance to Benomyl in powdery mildew of cucurbits. *Plant. Dis. Rep.*, **53**: 271-275.
- SHIPTON P.J. (1973). *2nd. Int. Congr. Pl. Path.*, Abstr. 0836.
- VANDERPLANK J.E. (1982). *Host-pathogen interaction in plant disease*: New and London, Academic Press. 207 pp.
- WARREN C.G., SANDERS P., COLE H. (1974). *Sclerotinia homoeocarpa* tolerance to benzimidazole configuration fungicides. *Phytopathol.*, **64**: 1139-1142.
- WUEST P.J., COLE H., SANDERS P.L. (1974). Tolerance of *Vericillium malthrousei* to benomyl. *Phytopathology*, **64**.

(Aceptado para su publicación: 18 febrero 1991)