

CARACTERITZACIÓ D'AÏLLATS DE *BOTRYTIS CINEREA* PERS. RESISTENTS A FUNGICIDES EN L'ÀREA DE PRODUCCIÓ HORTÍCOLA DEL LITORAL BARCELONÍ

E. Capdevila, S. García, A. Navarro, M.T. Mas i
F.J. Sorribas
Departament d'Agronomia,
Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Resum

Botrytis cinerea Pers. és el fong causant de la podridura grisa. El seu control es realitza bàsicament amb fungicides, encara que l'aparició de poblacions resistents redueix l'eficàcia d'aquest control. L'objectiu d'aquest treball ha estat la caracterització *in vitro* d'aïllats de *B. cinerea* resistents a benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb procedents de tomàquet cultivat en hivernacle a les comarques del Maresme i del Baix Llobregat. Es van mostrejar un total de 10 hivernacles dels quals es van obtenir 90 aïllats de *B. cinerea*, 50 del Maresme i 40 del Baix Llobregat. Tots els aïllats es van mostrar sensibles a carbendazima + dietofencarb. Dels 50 aïllats procedents del Maresme, un 56% era doble resistent a benomil i procimidona (B^RP^RCD^S), un 24% era sensible a benomil i resistent a procimidona (B^SP^RCD^S), un 2% era resistent a benomil i sensible a procimidona (B^RP^SCD^S) i un 18% era sensible als tres fungicides (B^SP^SCD^S). Dels 40 aïllats recollits al Baix Llobregat, un 75% era resistent a benomil i procimidona, un 15% era sensible a benomil i resistent a procimidona i un 10% era sensible a tots tres fungicides. En cap dels hivernacles mostrats es van detectar aïllats triple resistents (B^RP^RCD^R). Els aïllats caracteritzats com a resistents van presentar un grau de resistència alt (CI50 aïllats resistents / CI50 aïllat sensible < 100).

Mots clau

Benzimidazoles, *Botrytis cinerea*, carbendazima + dietofencarb, dicarboximides, resistència a fungicides.

Resumen

Botrytis cinerea Pers. es el hongo causante de la podredumbre gris. El control de la enfermedad se realiza mediante la aplicación de fungicidas, aunque la aparición de poblaciones resistentes reduce la eficacia de los tratamientos. El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar *in vitro* aislados de *B. cinerea* resistentes a benomil, procimidona y carbendazima + dietofencarb procedentes de tomaters cultivadas en invernaderos comerciales de las comarcas del Maresme y del Baix Llobregat. Se muestrearon un total de 10 invernaderos de los cuales se obtuvieron 90 aislados, 50 del Maresme y 40 del Baix Llobregat. Todos los aislados fueron sensibles a carbendazima + dietofencarb. De los 50 aislados procedentes del Maresme, un 56% era doble resistente a benomil y procimidona (B^RP^RCD^S), un 24% era sensible a benomil y resistente a procimidona (B^SP^RCD^S), un 2% era resistente a benomil y sensible a procimidona (B^RP^SCD^S) y un 18% era sensible a los tres fungicidas. De los 40 aislados procedentes del Baix Llobregat, un 75% era resistente a benomil y procimidona, un 15% era sensible a benomil y resistente a procimidona y un 10% era sensible a los tres fungicidas. En ningún invernadero se detectaron aislados triple resistentes (B^RP^RCD^R). Los aislados caracterizados como resistentes presentaban un grado de resistencia alto (CI50 aislados resistentes / CI50 aislado sensible > 100).

Palabras clave

Benomil, *Botrytis cinerea*, carbendazima + dietofencarb, dicarboximida, resistencia a fungicidas.

Abstract

Botrytis cinerea Pers. is a plant pathogenic fungus that causes grey mould. Disease control is mainly by fungicides, but the occurrence of fungicide resistant strains decreases control effectiveness. The objective of this work was the *in vitro* characterization of resistant isolates of *B. cinerea* to benomyl, procymidone and carbendazim + diethofencarb from tomato crops growing in commercial greenhouses in the counties of Maresme and Baix Llobregat. Ten greenhouses were surveyed and 90 isolates were collected, 50 from Maresme and 40 from Baix Llobregat. All isolates were sensitive to carbendazim + diethofencarb. Out of 50 isolates collected in Maresme, 56% were resistant to both benomyl and procymidone (B^RP^RCD^S), 24% were benomyl-sensitive and procymidone-resistant (B^SP^RCD^S), 2% were benomyl-resistant and procymidone-sensitive and 18% were sensitive to all three fungicides. Out of 40 isolates collected in Baix Llobregat, 75% were double resistant, 15% were benomyl-sensitive and procymidone-resistance, and finally, 10% were sensitive to all three fungicides. Triple resistant isolates were not found (B^RP^RCD^R). Resistant isolates had a high resistance level (EC50 resistant isolate / EC50 sensitive isolate > 100).

Key words

Benzimidazole, *Botrytis cinerea*, carbendazim + diethofencarb, dicarboximide, fungicide resistance.

Introducció

La malaltia causada pel fong *Botrytis cinerea* Pers. es coneix amb el nom de podridura grisa. El rang d'hostes és molt ampli, i ha estat citada en 235 espècies diferents (MACFARLANE 1968). La podridura grisa afecta tant a cultius a l'aire lliure com a cultius en hivernacle. Les condicions temperades i humides afavoreixen el desenvolupament de la malaltia, que pot provocar pèrdues severes de producció. La sensibilitat dels diferents cultius hortícoles a *B. cinerea* varia en funció de l'espècie; així, l'albergínia es considera molt sensible, el pebrot i el tomàquet són mitjanament sensibles, i la mongeta i el cogombre és mitjana-baixa. Diverses avaluacions en cultius de pebrot i albergínia en hivernacle del litoral andalús durant les campanyes 1981-1982 i 1982-1983 van mostrar que el percentatge de plantes de pebrot afectades per la podridura grisa era del 55% i el 43%, mentre que el percentatge de plantes d'albergínia afectades era del 99% i el 72%, respectivament (LÓPEZ 1994). Les pèrdues econòmiques de producció poden ser majors del 50% en molts cultius segons quines siguin les condicions ambientals. A més, el cost d'intervenció per combatre la malaltia suposa un encariment del cost de producció. A Europa, els anys 1992 i 1993, el 25%-30% de vinyes va ser tractat amb fungicides amb un cost estimat d'aplicació d'entre 20 i 50 milions d'euros (CABI 2000).

El control de *B. cinerea* és difícil, ja que pot afectar qualsevol part de la planta i en qualsevol estadi de desenvolupament. A més, poden produir-se infeccions latents que es desenvolupen en postcollita. El control de la malaltia es fa principalment mitjançant l'aplicació de fungicides. Malgrat que no hi ha dades estadístiques de la utilització de fungicides, es considera que a la zona del sud-est i el nord-est espanyol els grups de fungicides més utilitzats per ordre d'importància són: les dicarboximides, els benzimidazoles i altres fungicides d'ampli espectre com ara la diclofluanida i el clortalonil (RAPOSO *et al.* 1995). No obstant això, han estat citats casos d'aïllats de *B. cinerea* resistents als benzimidazoles (PORTA-PUGLIA 1978; MAUDE 1980; GULLINO i GARBALDI 1987), les dicarboximides (GULLINO *et al.* 1982; KATAN 1982; LEROUX i CLERIEAU 1985; FRAILE *et al.* 1986) i la barreja de carbendazima + dietofencarb (N-fenilcarbamat) (KATAN *et al.* 1989). Els

aïllats de *B. cinerea* poden manifestar resistència múltiple a benzimidazoles i dicarboximides (PAPPAS *et al.* 1979; WANG *et al.* 1986; MOORMAN i LEASE 1992) o a benzimidazoles, dicarboximides i N-fenilcarbamats (FARETRA *et al.* 1989; ELAD *et al.* 1992; LEROUX i MONCOBLE 1994; RAPOSO *et al.* 1996). Per tant, és necessari determinar la presència d'aïllats resistents a fungicides en una àrea de producció agrícola determinada, així com la seva freqüència, per dissenyar estratègies d'ús dels fungicides que permetin controlar la malaltia i que no afavoreixin la selecció i/o inducció d'aïllats resistents a les matèries actives més eficaçes. Amb aquest plantejament es van realitzar dos treballs (CAPDEVILA 1999; GARCÍA i NAVARRO 1999) amb l'objectiu de conèixer les característiques de poblacions de *B. cinerea* presents a l'àrea de producció hortícola del litoral barceloní. El primer dels treballs (CAPDEVILA 1999) va proporcionar la informació bàsica necessària per caracteritzar aïllats de *B. cinerea in vitro* mitjançant un test qualitatiu que utilitzava dosis de fungicida discriminants i va contrastar aquests resultats amb assaigs realitzats en condicions *in vivo* sobre cotilèdons de meló. Alhora, es va contrastar l'eficàcia de nous fungicides antibotritis en condicions *in vitro*, tot determinant la concentració que inhibeix el creixement del miceli al 50% (CI50). En el segon dels treballs (GARCÍA i NAVARRO 1999), es va caracteritzar la sensibilitat d'aïllats de *B. cinerea* procedents de mostres de tomàquet infectades que es cultivaven en hivernacle a les comarques del Maresme i el Baix Llobregat, i es van determinar l'activitat dels fungicides assajats i el nivell de resistència dels aïllats.

Contrasts d'eficàcia *in vitro* de diferents fungicides comercials a base de benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb envers el *B. cinerea*

La determinació de l'eficàcia de fungicides *in vitro* amb fórmules comercials ha de tenir en compte la possibilitat que tinguin eficàcies diferents, ja que els coadjuvants presents en diferents fórmules comercials a base de la mateixa matèria activa podrien modificar les característiques fisicoquímiques del medi de cultiu i repercutir sobre el creixement del miceli del fong. Per tant, és important determinar l'efecte de diferents

productes comercials sobre el desenvolupament del fong.

Es va determinar la resposta de quatre aïllats de *B. cinerea* a 7 fórmules comercials a base de benomil 50% WP [Benlate (Du Pont), Aframyl (Afrasa), Benmar 50 (Sarabia), Benomilo 50 (Aragonesas), Benopron (Probelte), Fundazol 50 WP (Indukern) i Benofit (Agrocalidad)], dos a base de procimidona 50% [Kenolex 50 WP (KenoGard) i Sumislex 50 WP (C. Q. Massó)] i dos a base de carbendazima 25% + dietofencarb 25% WP [Sumico 50 WP (C. Q. Massó) i Sumifol 50 WP (KenoGard)]. Els aïllats de *B. cinerea* utilitzats en aquest estudi van ser obtinguts de la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT) (aïllats 2850 i 2996) i de mostres de pebrot infectades procedents de la província de Múrcia (aïllats R i 3R). Els aïllats es van cultivar en patata-dextrosa-agar (PDA) amb 100 mg L⁻¹ de sulfat d'estreptomícina a 18°C. De cada aïllat es va transferir un disc de miceli en creixement a PDA per produir suficient inòcul per desenvolupar l'assaig. La col·lecció d'aïllats es va conservar en aigua destil·lada estèril i gel de sílice per a la realització dels estudis posteriors.

Es va dur a terme un assaig per determinar qualitativament la resistència a benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb mitjançant dosis discriminants del fungicida. Discs de 6 mm de diàmetre del marge de la colònia de cadascun dels aïllats van ser transferits a càpsules de Petri amb PDA que contenien 1 mg m.a. L⁻¹ de benomil, 5 mg m.a. L⁻¹ de procimidona, 6 mg m.a. L⁻¹ de la barreja carbendazima + dietofencarb i medi de cultiu sense fungicida (controls). Cada combinació aïllat-fungicida es va repetir tres vegades. Els cultius es van incubar a 18°C i amb foscor. El creixement del miceli es va avaluar al cap de 3 dies. Els aïllats es van considerar resistents o sensibles al fungicida segons si el miceli creixia o no en el medi de cultiu, respectivament. Quan hi havia creixement es va mesurar el diàmetre de la colònia i es va calcular el percentatge d'inhibició. Les dades es van transformar segons la transformació angular i es van sotmetre a anàlisi de variància per determinar la igualtat o diferència entre fórmules comercials agrupades per matèria activa.

Dels quatre aïllats utilitzats en l'assaig, els aïllats 2850 i 2996 es van mostrar sensibles a totes les fórmules a base de benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb, mentre que

els aïllats R i 3R es van mostrar resistents a benomil i procimidona i a benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb, respectivament, sense que hi hagués diferències significatives entre fórmules a base de la mateixa matèria activa. Els resultats d'aquest estudi posen de manifest que la utilització de diferents fórmules comercials antibotritis assajades a base de la mateixa matèria activa no es pot considerar un factor de variabilitat dels resultats i, per tant, poden utilitzar-se indistintament per copsar l'estat de la resistència de *B. cinerea*.

Caracterització d'aïllats de *Botrytis cinerea* resistents a benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb *in vivo*

Encara que els assaigs qualitius en condicions *in vitro* són més ràpids de fer perquè permeten treballar amb un nombre d'aïllats molt més gran per unitat de temps, els assaigs *in vivo* permeten donar una visió més realista del que pot ocórrer en situació de camp. Per tal de validar l'assaig qualitatiu realitzat prèviament, vàrem plantejar un assaig en condicions *in vivo*.

La sensibilitat de cadascun dels aïllats als fungicides es va determinar segons l'habilitat d'infectar cotilèdons de meló cv. Ricamiel tractats amb la dosi comercial recomanada. El planter va ser produït en safates alveolades en condicions d'humiditat a saturació i amb 20°C de temperatura i foscor. Quan les llavors van geminar, les plàntules es van transferir a un hivernacle on es van desenvolupar fins a l'aparició de la primera fulla veritable. En aquest estadi de desenvolupament, les plàntules de meló es van tractar amb els fungicides Benlate (benomil 50% WP), Kenolex 50 WP (procimidona 50% WP) i Sumifol 50 WP (carbendazima 25% + dietofencarb 25%) WP a dosis d'1,5 g p.c. L⁻¹, 1 g p.c. L⁻¹ i 1,5 g p.c. L⁻¹, respectivament, amb un polvoritzador manual fins al punt de degoteig. Es van incloure plantes polvoritzades amb aigua destil·lada com a control. Cinc hores després de polvoritzar les plàntules es van seccionar els cotilèdons i es van transferir a càpsules de Petri que contenien paper de filtre estèril saturat amb aigua destil·lada estèril. Cada càpsula contenia 5 cotilèdons, damunt dels quals es va dipositar un disc de miceli de 6 mm de diàmetre del marge de la colònia, i es va incubar a 20°C i amb foscor. Al cap de sis dies es va

avaluar l'assaig i es va considerar que l'aïllat era resistent al fungicida si els cotilèdons presentaven podridura tova, fosca i vítria, símptomes d'haver estat infectats per *B. cinerea*. Alhora es va distingir entre podridura i podridura amb esporulació. Cada combinació de cotilèdon per tractament i aïllat es va repetir deu vegades.

Tots els aïllats van infectar els cotilèdons de meló control polvoritzats amb aigua destil·lada i la majoria van esporular, a excepció de l'aïllat 2996. El comportament dels aïllats assajats en cotilèdons tractats amb fungicides va ser diferent. Així, mentre que els aïllats 2850 i 2996 es van mostrar sensibles als tres fungicides aplicats a la dosi comercial recomanada, els aïllats R i 3R es van mostrar resistents a la fórmula a base de benomil i procimidona i a les fórmules a base de benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb, respectivament, amb infecció de la mostra i esporulació profusa. Els resultats de l'assaig *in vivo* van ser coincidents amb els de l'assaig *in vitro*. Per tant, els assaigs *in vitro* són una eina vàlida per determinar l'estat de resistència als fungicides i copsar de forma ràpida la freqüència d'aïllats resistents al camp i la seva evolució en una àrea de producció determinada.

Determinació de l'eficàcia de nous productes específics antibotritis *in vitro*

El desenvolupament i la comercialització de nous fungicides per controlar el *B. cinerea* fa necessària la realització d'assaigs per rebutjar l'existència de resistència creuada amb matèries actives existents, així com per determinar el risc de selecció i/o inducció d'aïllats resistents a les noves fórmules.

Dues fórmules comercials noves, Switch (ciprodinil 37,5% + fludioxonil 25% WG, Novartis Agro) i Teldor (fenhexamida 50%, Bayer), van ser assajades en condicions *in vitro* per determinar la CI50 dels quatre aïllats del fong. Les condicions de l'assaig van ser les mateixes que les descrites anteriorment. Les dosis assajades per a cada fórmula van ser d'1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 i 0,01 mg m.a. L⁻¹. Cada combinació fungicida-dosi-aïllat es va repetir 5 vegades. Al cap de tres dies es va mesurar el creixement radial de la colònia i es va calcular el percentatge d'inhibició. Les dades van ser analitzades segons l'anàlisi

si pròbit (FINNEY 1980); es va calcular la CI50 i es va contrastar entre aïllats i fórmules.

La majoria dels aïllats es van mostrar sensibles a Switch i Teldor a dosis d'1 mg m.a. L⁻¹ i van inhibir totalment el creixement del miceli, a excepció de la combinació Switch-3R, on la inhibició del creixement del miceli va ser inferior al 95%. La CI50 de Teldor no va diferir entre aïllats, mentre que la CI50 de Switch va ser inferior per als aïllats 2850 i R (taula 1). SURY *et al.* (1997) van determinar que 0,2 mg m.a. L⁻¹ de fenhexamida era la dosi discriminant entre aïllats resistents i sensibles a fenhexamida. Tot i que no es disposa d'informació en relació amb Switch, la diferència de CI50 entre aïllats fa suposar l'existència d'un cert grau de tolerància al fungicida per part de l'aïllat 2996 i, en major mesura, de l'aïllat 3R. Aquests resultats conviden a desenvolupar estudis de seguiment dels aïllats de *B. cinerea* per determinar el possible increment d'aquesta tolerància al fungicida que podria implicar el desenvolupament d'aïllats resistents amb el temps.

Taula 1. Concentració d'inhibició del 50% (CI50) del creixement del miceli de quatre aïllats de *B. cinerea* en Switch (ciprodinil 37,5% + fludioxonil 25%) i Teldor (fenhexamida 50%) en condicions *in vitro*.

Aïllat de <i>B. cinerea</i>	Switch	Teldor
2850	0,041 (0,028, 0,058) c	0,052 (0,035, 0,076) a
2996	0,079 (0,062, 0,100) b	0,049 (0,030, 0,077) a
R	0,040 (0,033, 0,058) c	0,064 (0,053, 0,078) a
3R	0,233 (0,154, 0,382) a	0,056 (0,041, 0,074) a

Cada dada és la mitjana de cinc repeticions. Dades de la mateixa columna seguides de la mateixa lletra no difereixen significativament segons l'anàlisi pròbit ($P > 0,05$).

Caracterització *in vitro* d'aïllats de *B. cinerea* resistents a benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb procedents del litoral barceloní

El mostratge es va dur a terme en hivernacles destinats a la producció de tomàquet a les comarques del Maresme i el Baix Llobregat. La localització dels hivernacles on es desenvolupa la malaltia es va fer amb l'ajut dels responsables tècnics de les agrupacions de defensa vegetal del Baix Maresme i el Baix Llobregat. Es van

prendre mostres vegetals infectades per *B. cinerea* de 9 hivernacles, 5 al Maresme i 4 al Baix Llobregat. L'aïllament del fong es va fer a partir de lesions de fulles, peciols o fruits que presentaven fructificació del fong. Porcions de la fructificació es van incubar en càpsules de Petri que contenien patata-dextrosa-agar (PDA) amb 100 mg L⁻¹ de sullat d'estreptomicina a 18°C. De cada aïllat es va transferir un disc de miceli en creixement a PDA per produir suficient inòcul per desenvolupar l'assaig. En total es van obtenir 90 aïllats de 10 hivernacles. La col·lecció d'aïllats es va conservar en aigua destil·lada estèril per a la realització dels estudis posteriors.

Es va fer un assaig per determinar qualitativament la resistència a benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb mitjançant dosis discriminants del fungicida. Discs de 6 mm de diàmetre del marge de la colònia de cadascun dels aïllats van ser transferits a càpsules de Petri amb PDA que contenien 1 mg m.a. L⁻¹ de benomil (Benomilo 50), 5 mg m.a. L⁻¹ de procimidona (Sumixcle 50) i 6 mg m.a. L⁻¹ de la barreja carbendazima + dietofencarb (Sumico 50). Els aïllats 2996 i 3R van ser inclosos com a control sensible i resistent als tres fungicides. Cada combinació aïllat-fungicida es va repetir tres vegades. Els cultius es van incubar a 18°C i amb foscor. El creixement del miceli es va avaluar 3, 6, 9 i 12 dies després de la sembra per determinar si es mantenia la inhibició del creixement del fong.

En tots els hivernacles mostrejats es van detectar aïllats de *B. cinerea* resistents a benzimidazoles i dicarboximides. Tan sols el 18% i el 10% dels aïllats es van mostrar sensibles als tres fungicides assajats al Maresme i al Baix Llobregat, respectivament (taula 2). La tendència de la freqüència d'aïllats resistents als diferents fungicides va ser semblant en ambdues comarques. La majoria dels aïllats es va mostrar resistent a benomil i procimidona conjuntament i es van caracteritzar com a doble resistent (B^RP^RCD^S). La freqüència d'aïllats resistents a procimidona (B^SP^RCD^S) va ser superior a la d'aïllats resistents a benomil (B^RP^SCD^S), i no es van detectar aïllats resistents a la barreja carbendazima + dietofencarb (taula 2).

El major percentatge d'aïllats resistents a procimidona trobats a les zones del Maresme i del Baix Llobregat es podria explicar a través del programa de tractaments que s'ha seguit en

Taula 2. Freqüències relatives dels fenotips d'aïllats de *B. cinerea* procedents d'hivernacles de les comarques del Maresme i el Baix Llobregat en relació amb la resistència a benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb.

Aïllats	Fenotip d'aïllats de <i>B. cinerea</i>				
	B ^S P ^S CD ^S	B ^R P ^S CD ^S	B ^R P ^R CD ^S	B ^S P ^R CD ^S	B ^R P ^R CD ^R
Maresme					
Número	9	1	28	12	0
Percentatge	18%	2%	56%	24%	0%
Baix Llobregat					
Número	4	0	30	6	0
Percentatge	10%	0%	75%	15%	0%

B^S i B^R: sensible i resistent a benomil.

P^S i P^R: sensible i resistent a procimidona.

CD^S i CD^R: sensible i resistent a la barreja de carbendazima i dietofencarb.

aquestes àrees. Així, durant la campanya 1998-1999, més d'un 85% dels tractaments es va realitzar amb matèries actives de la família de les dicarboximides (procimidona, iprodiona). La família de les dicarboximides ha estat la més utilitzada durant molts anys per combatre el *B. cinerea* en la zona d'estudi (MARTÍ I GUAL, com. pers.). La resistència del *B. cinerea* als fungicides de la família de les dicarboximides és, segons LEROUX *et al.* (1993), de tipus no persistent. L'estudi realitzat per aquest autor en vinya va demostrar que una aturada dels tractaments amb aquests productes durant tres campanyes permetia reduir d'un 87% a un 22% el percentatge mitjà d'aïllats resistents. Aquesta regressió està probablement lligada al fet que els aïllats resistents presenten una menor capacitat competitiva en termes de capacitat infectiva, reproductiva i de supervivència (*fitness*) que els aïllats sensibles. L'alta eficàcia inicial que presentaven aquestes matèries actives, la llarga persistència i el seu ús reiterat devien incrementar la pressió selectiva afavorint el desenvolupament de races resistents fins a arribar a una situació com l'actual.

Cal destacar l'alt percentatge trobat d'aïllats resistents a benomil, tenint en compte que actualment i segons les enquestes realitzades és una matèria activa en desús. El benomil pot donar lloc a fenòmens de resistència genètica als fungicides de tipus persistent, és a dir, que la *fitness* de les poblacions resistents és igual a la de

les sensibles (LEROUX 1984). Això podria causar que, tot i que actualment no es tracta amb aquesta matèria activa, encara es detectin aïllats resistents.

En el nostre estudi no s'ha considerat cap assaig per determinar la *fitness* dels aïllats, tot i que es podria tractar d'un paràmetre a tenir en compte a l'hora de dissenyar un programa de control químic. Encara que aquests resultats podrien semblar alarmants s'han de prendre amb cautela, ja que s'haurien de tenir en compte molts més factors que podrien interaccionar els uns amb els altres. Segons VALI (1992), els resultats en relació amb la *fitness* són conflictius, en part perquè el *B. cinerea* és genèticament heterogeni i perquè les diferències pel que fa a la *fitness* poden ser atribuïdes a factors independents de la resistència als fungicides.

En els últims anys s'ha començat a utilitzar la barreja carbendazima + dietofencarb, que explota la resistència creuada negativa que hi ha entre ambdós productes. Tot i que a les àrees mostrejades no s'ha detectat cap aïllat que presenti resistència a aquesta barreja, s'han fet estudis en els quals s'ha detectat un increment de la resistència un any (SATUB 1991) o dos anys (KATAN *et al.* 1989) després d'iniciar-ne l'aplicació. Al litoral barceloní no s'ha trobat cap aïllat resistent a aquesta barreja. Tenint en compte aquests resultats, la barreja C+D es podria integrar dins d'un programa de tractament per combatre el *B. cinerea*, respectant les estratègies per evitar l'aparició de resistències.

Avaluació de l'activitat del fungicida

Es van fer proves per conèixer la forma d'actuar del fungicida, l'activitat fungitòxica (mort del fong) o l'activitat fungiestàtica (aturada del desenvolupament però sense mort). Alguns dels aïllats de l'assaig anterior, que no havien crescut en la càpsula de Petri al tercer o sisè dia després de la sembra, es van transferir a PDA sense fungicida i es van incubar a 18°C i amb foscor. El creixement del miceli va ser avaluat als 3, 6, 9 i 12 dies després de la sembra. Els aïllats sembrats en PDA, després d'haver estat en contacte amb el fungicida durant 3 o 6 dies, van acabar desenvolupant-se fins a colonitzar tota la superfície de la càpsula de Petri. Els aïllats que havien estat en contacte amb benomil i procimidona van colo-

nitzar tota la placa al sisè dia, mentre que els que havien estat en contacte amb C+D no ho van fer fins al novè o dotzè dia. Aquest fet indica que l'acció de la fórmula sobre els aïllats és fungistàtica i que els aïllats poden desenvolupar-se en absència del fungicida. L'acció dels fungicides, en aquest cas, permetria retardar el creixement actiu del fong i, conseqüentment, l'increment de la malaltia, que no evolucionaria si hi hagués un canvi de les condicions ambientals que dificultés la capacitat d'infecció i desenvolupament del fong.

Determinació del nivell de resistència dels aïllats de *B. cinerea* resistents a benomil, procimidona i carbendazima + dietofencarb

El grau de resistència a fungicides és un paràmetre important a conèixer per avaluar l'efecte del fungicida al camp. El grau de resistència es determina segons la relació CI50 aïllat resistent / CI50 aïllat sensible. Així, un grau de resistència baix (5 a 10) no implica una pèrdua d'eficàcia apreciable al camp, mentre que un nivell alt (<100) implica una pèrdua total d'eficàcia al camp (LEROUX 1984).

Es va dissenyar un assaig per determinar el grau de resistència a benomil i procimidona dels aïllats de *B. cinerea* procedents del litoral barceloní. Es van determinar les CI50 dels 9 aïllats sensibles a benomil i dels 3 aïllats sensibles a procimidona que havien estat prèviament caracteritzats en l'assaig anterior. Dels aïllats resistents, es van assajar aquells en què el creixement micelià no diferia de l'aïllat de referència 3R. Els aïllats sensibles es van sembrar en càpsules de Petri que contenien PDA amb dosis creixents de benomil (de 0,005 a 1 mg m.a. L⁻¹) i de procimidona (de 0,005 a 5 mg m.a. L⁻¹). Les dosis utilitzades per obtenir la CI50 dels aïllats resistents van oscil·lar entre 10 i 50 mg m.a. L⁻¹ de benomil i entre 12,5 i 75 mg m.a. L⁻¹ de procimidona. Cada combinació fungicida-aïllat es va repetir 3 vegades. Els cultius es van incubar a 18°C i a les fosques. El creixement radial es va mesurar 3 dies després de la sembra. Les dades van ser analitzades segons l'anàlisi pròbit.

La CI50 de la majoria dels aïllats sensibles va ser similar a la de l'aïllat de referència 2996, excepte en els aïllats BL116 i BL1119, que va ser

superior ($P < 0,05$). La CI50 de l'aïllat sensible per calcular el grau de resistència va ser la mitjana de la CI50 dels aïllats que no van diferir de l'estàndard 2996. Els aïllats resistents van créixer en totes les concentracions de fungicida assajades i en cap cas es va aconseguir reduir el creixement del miceli per sota del 50%. L'increment de la dosi per al càlcul no va ser possible, ja que la quantitat de fórmula necessària era tal que hi havia problemes per dissoldre-la en etanol. La determinació d'aquest paràmetre requeriria l'ús de matèria activa pura.

Els resultats d'aquest assaig mostren que els aïllats resistents presentaven un grau de resistència alt, la qual cosa fa pensar que l'ús de benzimidazoles i dicarboximides en la zona d'estudi no comportarà un control eficaç de la malaltia.

Consideracions finals

L'aparició de soques resistents de *B. cinerea* és un dels principals factors que contribueixen a la pèrdua d'eficàcia dels tractaments fungicides. La millor forma d'evitar aquest fenomen és integrar un programa de tractaments adequat amb pràctiques culturals i biològiques. Un bon programa de tractaments es basa en l'alternança o la barreja de productes de famílies químiques diferents que tinguin diferents punts d'acció sobre la fisiologia del fong (multipunt). Les recomanacions del grup de treball FRAC-Dicarboximides van encaminades cap a la utilització d'una barreja de dicarboximida i de tiram o d'un altre fungicida multipunt. Aquesta recomanació és vàlida sempre que no s'hagin detectat en la zona aïllats resistents a les dicarboximides i que aquesta barreja s'utilitzi de forma preventiva. Cada vegada s'utilitza més la combinació d'un producte

d'acció específica amb un multipunt que permet millorar l'eficàcia sense modificar la pressió de selecció envers les soques resistents.

Les empreses de plaguicides s'esforcen per treure al mercat nous productes amb noves matèries actives que intenten controlar la podridura grisa. En els últims anys han aparegut un gran nombre de fungicides amb acció antibotrítica, com ara Switch, Teldor, Fubotec, Stroby, Scala, etc. És en aquest moment quan cal adoptar una bona estratègia d'ús dels fungicides que eviti l'aparició de noves resistències.

El coneixement de l'estat de la resistència de les poblacions de *B. cinerea* a cada zona és un altre dels elements a tenir en compte a l'hora de combatre la malaltia. Els assaigs *in vitro* realitzats en aquest treball són una manera senzilla i ràpida de determinar l'estat de la resistència. La informació obtinguda és valuosa, però no es pot extrapolar de forma indiscriminada a la situació de camp sense una validació prèvia mitjançant estudis *in vivo* i estudis de camp.

Agraïments

Agraïm la col·laboració dels responsables tècnics de les agrupacions de defensa vegetal del Baix Maresme i el Baix Llobregat, Montserrat Martí i Mariona Pagès, respectivament, per facilitar la localització d'hivernacles infestats de *B. cinerea* i per proporcionar informació sobre l'ús de fungicides antibotritis a la zona. També donem les gràcies a Júlia Pérez pel seu suport al laboratori, i a les empreses Afrasa, Agrocaldidat, Aragonesas, Bayer, C. Q. Massó, Indukern, KenoGard, Novartis, Probelte i Sarabia per aportar les fórmules comercials utilitzades en aquest treball.

Bibliografia

- CAB INTERNATIONAL (2000). *Crop Protection Compendium*. Wallingford, UK: Cab International.
- CAPDEVILA, E. (1999). "Eficàcia de fungicides sobre *Botrytis cinerea* Pers.". [Treball de fi de carrera.] Barcelona: Escola Superior d'Agricultura de Barcelona.
- FARITRA, F.; POLLASTRO, S.; DI TONNO, A. P. (1989). "New natural variants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) coupling benzimidazole-resistance to insensitive toward the N-phenylcarbamate diethofencarb". A: *Phytopathologia Mediterranea*, 28: 98-104.

- ELAD, Y.; YUNIS, H.; KATAN, T. (1992). "Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel". A: *Plant Pathology*, 41: 41-46.
- FINNEY, D. J. (1980). *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge United Kingdom.
- FRAILE, A.; ALONSO, A.; MATEO-SAGASTA, E. (1986). "Some characteristics of *Botrytis cinerea* isolates tolerant to procymidone". A: *Plant Pathology*, 35: 1-4.

- GARCÍA, S.; NAVARRO, A. (1999). "Caracterització d'aïllats de *Botrytis cinerea* Pers. resistent a fúngicides a l'àrea de producció hortícola del litoral barceloní". Barcelona: Escola Superior d'Agricultura de Barcelona. [Treball de fi de carrera.]
- GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. (1987). "Control of *Botrytis cinerea* resistant to benzimidazoles and dicarboximides with mixtures of different fungicides". A: *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, 52: 895-900.
- GULLINO, M. L.; ROMANO, M. L.; GARIBALDI, A. (1982). "Characterization of dicarboximides strains of *Botrytis cinerea* naturally occurring in Italy". A: *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, 47: 781-791.
- KATAN, T. (1982). "Resistance to dicarboximides in grey mold *Botrytis cinerea* on protected crops". A: *Plant Pathology*, 31: 133-141.
- KATAN, T.; ELAD, Y.; YUNIS, H. (1989). "Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*". A: *Plant Pathology*, 38: 86-92.
- LEROUX, P. (1984). "Phénomènes de résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides". A: *Etation de Phytiairie et Phytopharmacie*. INRA. Versailles. France. Pàg. 303-317.
- LEROUX, P.; CLERIEAU, M. (1985). "Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* to fungicides in french vineyards". A: *Crop Protection*, 4: 137-160.
- LEROUX, P.; MONCOMBLE, D. (1994). "Resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximides, benzimidazoles and phenylcarbamates in the Champagne vineyards". A: HEANEY, S.; SLAWSON, D.; HOLDOMON, D. W.; SMITH, M.; RUSSELL, P. E.; PARRY, D. W. [ed.]. *Fungicide resistance*. United Kingdom: British Crop Protection Council Monograph 60. Pàg. 267-270.
- LÓPEZ, C. (1994). "*Botrytis cinerea* Pers. Sanidad vegetal en la horticultura protegida". A: *Cursos Superiores*. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, 1/94: 295-316.
- MACFARLANE, H. H. (1968). "Plant host - pathogen index to volume 1-40 (1922-1961)". A: *Review of Applied Mycology*. Wallingford, UK: CAB International.
- MAUDE, R. B. (1980). "Disease control". A: COLEY-SMITH, J. R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W. R. [ed.]. *The Biology of Botrytis*. London. Academic Press. Pàg. 275-308.
- MOORMAN, G. W.; LEASE, R. J. (1992). "Benzimidazole- and Dicarboximide-Resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania Greenhouses". A: *Plant Disease*, 76: 477-480.
- PAPPAS, A. C.; COOKE, B. K.; JORDAN, V. W. L. (1979). "Insensitivity of *Botrytis* to iprodione, procymidone, and vinclozolin and their uptake by the fungus". A: *Plant Pathology*, 28: 71-76.
- PORTA-PUGLIA, A. (1978). "Comportamento verso i benzimidazolici di popolazioni di *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fkl. su pomodoro". A: *Tai Giornate Fitopatologiche* 5: 149-156.
- RAPOSO, R.; GÓMEZ, V.; DELCAN, J.; MELGAREJO, P. (1996). "Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses". A: *Plant Pathology*, 45: 497-505.
- STAUB, T. (1991). "Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use". A: *Annual Review Phytopathology*, 29: 421-442.
- SIFY, A.; PONTZEN, R.; STENZEL, K. (1997). "KBR 2738: Mode d'action et sensibilité de *Botrytis cinerea*". A: *Cinquième conférence internationale sur les maladies des plantes*, Tours 3-5 Decembre 1997. 561-568.
- VALL, R. J. I MOORMAN, G. W. (1992). "Influence of selected fungicide regimes on frequency of dicarboximide-resistant and dicarboximide-sensitive strains of *Botrytis cinerea*". A: *Plant Disease*, 76: 919-924.
- WANG, Z-N.; COLEY-SMITH, J. R.; WARREN, P. W. (1986). "Dicarboximide resistance in *Botrytis cinerea*". A: *Plant Pathology*, 35: 427-433.