

SITUACIÓN DE LA RESISTENCIA A TRIFLOXYSTROBIN Y DIFENOCONAZOLE DE POBLACIONES DE *VENTURIA INAEQUALIS* EN URUGUAY, ESTRATEGIAS DE MANEJO ANTIRRESISTENCIA

Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino¹, Ing. Agr. Leticia Casanova¹, Ing. Agr. Antonella Celio¹, Ing. Agr. Carolina Leoni² MSc, Dra. Ing. Agr. Sandra Alaniz¹

¹ Unidad de Fitopatología, Facultad de Agronomía, UdelaR Av. Garzón 780, CP 12900. Montevideo, Uruguay. email: pmond@fagro.edu.uy

²Sección Protección Vegetal, Programa Nacional de Investigación en Fruticultura, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Las Brujas), Ruta 48, Km 10, Rincón del Colorado, Canelones 90200, Uruguay

La sarna causada por *Venturia inaequalis*, es la enfermedad que ocasiona las mayores pérdidas en el cultivo del manzano en el mundo. Las pérdidas son directas como resultado de la infección a la fruta e indirectas al disminuir el área foliar e incluso producir caída de hojas afectando de ese modo los rendimientos.

El manejo de esta enfermedad se basa en la combinación de diferentes estrategias control químico realizando aplicaciones de fungicidas preventivas y curativas. En cada temporada se realizan aplicaciones de rutina desde el inicio de la brotación hasta mediados a fines de diciembre, momento en que el riesgo de ataque por *V. inaequalis* disminuye debido que finaliza la producción de ascosporas (responsables de las infecciones primarias), a que las condiciones ambientales ya no son favorables al desarrollo de la enfermedad y a la mayor resistencia que poseen los tejidos maduros (Mondino y Alaniz, 2009).

El uso de fungicidas tiene el inconveniente de la pérdida de efectividad cuando su uso continuado provoca la selección de individuos resistentes en las poblaciones del patógeno. Algunas características de *V. inaequalis* como la capacidad de reproducirse sexualmente y su alta tasa de reproducción facilitan la aparición de individuos resistentes. Por su parte entre los fungicidas existen situaciones diversas, algunos tienen bajo riesgo de generar resistencia mientras que otros por actuar en algún sitio específico del hongo presentan una mayor vulnerabilidad.

Los fungicidas comúnmente utilizados de manera preventiva (captan, mancozeb, estrobilurinas) pertenecen a los denominados fungicidas de contacto mientras que para las aplicaciones curativas se utilizan fungicidas con capacidad de penetrar al vegetal (Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol) (Mondino et al, 2003; Alaniz et al, 2003). Los fungicidas como captan o mancozeb se utilizan desde hace muchos años. Su aplicación se realiza en forma anticipada a la ocurrencia de cada periodo de infección. En los últimos años para su aplicación se cuenta con la ayuda de los pronósticos meteorológicos que predicen los eventos de lluvia. Tanto captan como mancozeb deben ser aplicados anticipándose a la ocurrencia de lluvia y resisten hasta 60 mm

(Krueger 2010). Una ventaja comparativa de estos fungicidas es que aunque se han utilizado durante muchos años mantienen su efectividad debido a que su riesgo de generar resistencia es bajo (Damicone y Smith, 2009).

Los fungicidas del grupo de las estrobilurinas se caracterizan por tener una mayor residualidad y mayor resistencia al lavado por las lluvias que los fungicidas de contacto. Dos moléculas han sido registradas para su uso en manzanos contra *Venturia inaequalis*, kresoxim-methyl en 1996 y trifloxystrobin en 2003. Estos fungicidas inhiben la respiración mitocondrial al unirse a la subunidad bc1 del citocromo mitocondrial impidiendo el transporte de electrones (Ypema y Gold, 1999). Este modo de acción tan específico es el responsable del alto riesgo de generar resistencia que tiene este grupo de fungicidas. Conociendo este riesgo, estos fungicidas fueron los primeros en ser comercializados con una recomendación de realizar un manejo anti-resistencia consistente en limitar su uso a un máximo de tres aplicaciones por temporada (García et al., 1997). Esto no logró impedir el problema ya que en diferentes países se ha reportado la resistencia de *V. inaequalis* a estrobilurinas en aislados provenientes de montes comerciales (Lesniak et al, 2011; Broniarek-Niemiec y Bielenin, 2008; Vieira, 2009; Jobin y Carisse, 2007; Sallato et al, 2006). La Resistencia a estrobilurinas ha sido también reportada en otros hongos patógenos y el principal mecanismo es una simple sustitución de un aminoácido glicina por alanina en la posición 143 (G143A) de la proteína del citocromo b (Zheng et al, 2000). También ha sido reportada la resistencia cruzada entre fungicidas de este grupo como por ejemplo trifloxystrobin y kresoxim-methyl (Vincelli, 2002; Bartlet et al, 2002). Esto significa que cuando una población del hongo se torna resistente a uno de estos fungicidas también resulta resistente a los demás de ese grupo.

Los fungicidas del grupo de los Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE) son los más ampliamente usados en el control de la sarna en la etapa pos-infección por su acción curativa. Desde principios de la década de 1980 principios activos como difenoconazol, flusilazol y myclobutanil fueron ampliamente utilizados en estrategias curativas. En los últimos 10 años el difenoconazol ha sido el principio activo más utilizado en pos-infección en Uruguay. Para decidir las aplicaciones curativas agricultores y técnicos cuentan, desde hace muchos años, con la ayuda del sistema de alarma que informa de la ocurrencia de periodos de infección durante la etapa de liberación de ascosporas de *V. inaequalis* (García and Moscardi, 1981). Estos fungicidas poseen un sitio de acción específico interfiriendo la síntesis del ergosterol por lo que también poseen un alto riesgo de generar resistencia. En varias partes del mundo donde se cultivan manzanas ha sido reportada la presencia de poblaciones de *V. inaequalis* con sensibilidad reducida a varios fungicidas de este grupo (Stevic et al, 2010; Jobin and Carise, 2007; Köller et al, 1997; Smith et al, 1991) .

A partir del brote epidémico de sarna del manzano ocurrido durante la temporada 2007-2008, año en el que se observaron fallas en el control de *V. inaequalis* en numerosos montes de manzana, se especuló con que la resistencia podría ser una de las posibles causas. Por ello se iniciaron trabajos tendientes a evaluar la resistencia de

las poblaciones uruguayas de *V. inaequalis*, obtenidas de diferentes montes comerciales, a tryfloxystrobin y difenoconazole por ser ampliamente utilizados y poseer los mayores riesgos de generar resistencia. Para ello se contó con la colaboración inicial de la Cooperativa JUMECAL, DIGEGRA, INIA y la Facultad de Agronomía. Posteriormente se obtuvo financiamiento de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la UdelaR mediante el Programa de Vinculación con el Sector Productivo, actuando JUMECAL como contraparte de ese proyecto.

Estudio de resistencia de poblaciones de *V. inaequalis* a trifloxystrobin

Para medir la resistencia de los hongos a las estrobilurinas el Comité de Acción contra la Resistencia a Fungicidas (FRAC) (<http://www.frac.info/frac/index.htm>) recomienda utilizar el test de inhibición de la germinación de esporas (Stammler y Klappach, 2006). Este test compara la germinación de esporas creciendo en un medio al que se le ha agregado una alta concentración de fungicida con la germinación en el mismo medio sin fungicida. Este método es muy útil porque estos fungicidas son extremadamente potentes en inhibir la germinación de esporas, mucho más que el crecimiento del micelio (Slawewski et al, 2002). Además como la germinación de esporas ocurre rápidamente, es posible medir la resistencia en pocas horas. Por otra parte, se ha demostrado que este test tiene una alta correlación con la presencia de la mutación G143A en la población (Lesniak et al, 2011). Por lo tanto si en la población del hongo hay algún porcentaje de individuos que presentan esta mutación sus esporas tendrán la capacidad de germinar en presencia del fungicida y serán detectados por el test.

Como parte de un trabajo final de tesis se analizó la resistencia a trifloxystrobin en poblaciones de *Venturia inaequalis* provenientes de 10 montes de manzana de diferentes zonas y con diferentes historiales de uso de estrobilurinas. La ubicación de los montes, su historial de uso de estrobilurinas y el porcentaje de esporas resistentes se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Localización de los montes, historia de uso de estrobilurinas y niveles de resistencia obtenidos.

Monte	Localización	Historia de uso	% esporas resistentes ^c
1	Juanicó	aplicaciones excesivas ^a	95,0
2	Juanicó	aplicaciones excesivas	67,5
3	Melilla	aplicaciones excesivas	60,5
4	Melilla	dos temporadas con uso mínimo	54,1
5	Melilla	mínimo uso prolongado y sin aplicación en 3 últ. temporadas	36,2
6	Melilla	mínimo uso ^b	13,8
7	Sayago	sin aplicaciones	12,7
8	Progreso	mínimo uso	10,1
9	Melilla	mínimo uso	8,6
10	Melilla	mínimo uso	3,0

^a Más de tres aplicaciones de estrobilurinas por temporada durante varios años.

^b Tres o menos aplicaciones de estrobilurinas por temporada

^c % esporas resistentes = (% esporas germinadas en AA + trifloxystrobin (2 ppm) / % esporas germinadas en AA) x 100. Los valores presentados son el promedio de 4 repeticiones.

Los resultados muestran que la resistencia de *Venturia inaequalis* a fungicidas del grupo de las estrobilurinas se encuentra generalizada en toda la zona de producción de manzanas. Como era de esperarse en aquellos montes en que se hicieron aplicaciones excesivas los porcentajes de esporas resistentes fueron extremadamente altos, llegando al 95 % en un monte en el que se habían realizado más de 12 aplicaciones en la misma temporada. La segunda conclusión es que la recomendación de no realizar más de tres aplicaciones por temporada no fue suficiente para impedir el desarrollo de resistencia. Montes en los que nunca se excedió de tres aplicaciones presentaron altos porcentajes de individuos resistentes y la suspensión de las aplicaciones por tres años no logró revertir la situación, tal es la situación del monte 5. La presencia de esporas resistentes en montes sin historia de aplicación puede explicarse por la migración de esporas de un monte a otro. Por otra parte, es sabido que niveles relativamente bajos de resistencia (menores a 30%) rápidamente se convierten en niveles altos (cerca del 100%) como consecuencia de una única aplicación de estrobilurinas (Sundin et al, 2011b). Nuestros resultados indican que son suficientes dos años de aplicaciones de trifloxystrobin en un monte que no presentaba resistencia para que ésta aparezca, como pasó en el monte 4 ubicado en la zona de Melilla.

Estudio de resistencia de *V. inaequalis* a difenoconazole

El estudio de la resistencia a difenoconazole es bastante más complejo. En cada población de hongos existen individuos con diferentes niveles de sensibilidad o resistencia. Para saber si una población de hongos proveniente de un monte en particular tiene algún grado de resistencia, es necesario compararla con la resistencia de los individuos provenientes de otra población que no haya sido expuesta

anteriormente al fungicida. Para ello se deben poner a crecer los diferentes aislados provenientes de una y otra población en placas con concentraciones crecientes del fungicida.

En este trabajo se comparó la resistencia de dos poblaciones de *V. inaequalis* ubicadas las zonas de Juanicó y Las Brujas con otra perteneciente a un monte ubicado en Sayago sin historia de uso de fungicidas. En la tabla 2 se presenta la información de esos tres montes

Tabla 2. Localización, historia de uso de fungicidas IBE y número de aislados de *Venturia inaequalis* testados por resistencia a difenoconazol en los tres montes.

Monte	Localización	Historia de uso de IBE	Nº de aislados testados
1	Sayago	sin aplicaciones	33
2	Juanicó	más de 5 aplicaciones por temporada	33
3	Las Brujas	no más de 4 aplicaciones por temporada	33

Una manera de comparar la resistencia es mediante el cálculo del Factor de Resistencia (FR), este valor compara concentraciones efectivas 50 (CE50) promedio entre poblaciones del hongo provenientes de diferentes montes. Según los valores de FR las poblaciones de *V. inaequalis* de ambos montes comerciales presentaron menor sensibilidad a difenaconazol en comparación con la línea de base. Los valores de FR fueron de 6.9 y 5.3 para los montes con historias de uso racional y o de uso excesivo. (Tabla 3). Esto muestra que existe una mayor resistencia en las poblaciones expuestas al fungicida las que fueron 6,9 y 5,3 veces respectivamente más resistentes que la población nunca expuesta.

De acuerdo a estos resultados las curvas de distribución de la sensibilidad de ambos montes comerciales está desplazada hacia la derecha en comparación con la curva del monte sin historia de uso (Figura 1).

Tabla 3. Sensibilidad a difenoconazol de las poblaciones de *Venturia inaequalis* provenientes de tres montes con diferente historia de uso del fungicida expresada mediante rangos y factores de Resistencia.

Monte ^a	CE50 <i>in vitro</i> (ppm)			Fr ^b	fr ^c	FR ^d
	Min.	Media	Max.			
1 – Línea de base	0.0036	0.0305	0.0796	22	2.6	---
2 – Alto uso	0.0026	0.2101	1.3942	536	6.64	6.9
3 – Uso convencional	0.0011	0.1608	1.2598	1145	7.8	5.3

^a (1)- monte sin aplicaciones, (2) 5 o más aplicaciones por temporada, (3) 4 o menos aplicaciones por temporada.

^b Fr = Max CE50/min CE50

^c fr = Max CE50/Mean CE50

^d FR = CE50 promedio del monte / CE50 promedio del monte sin historia de uso del fungicida (Línea de base)

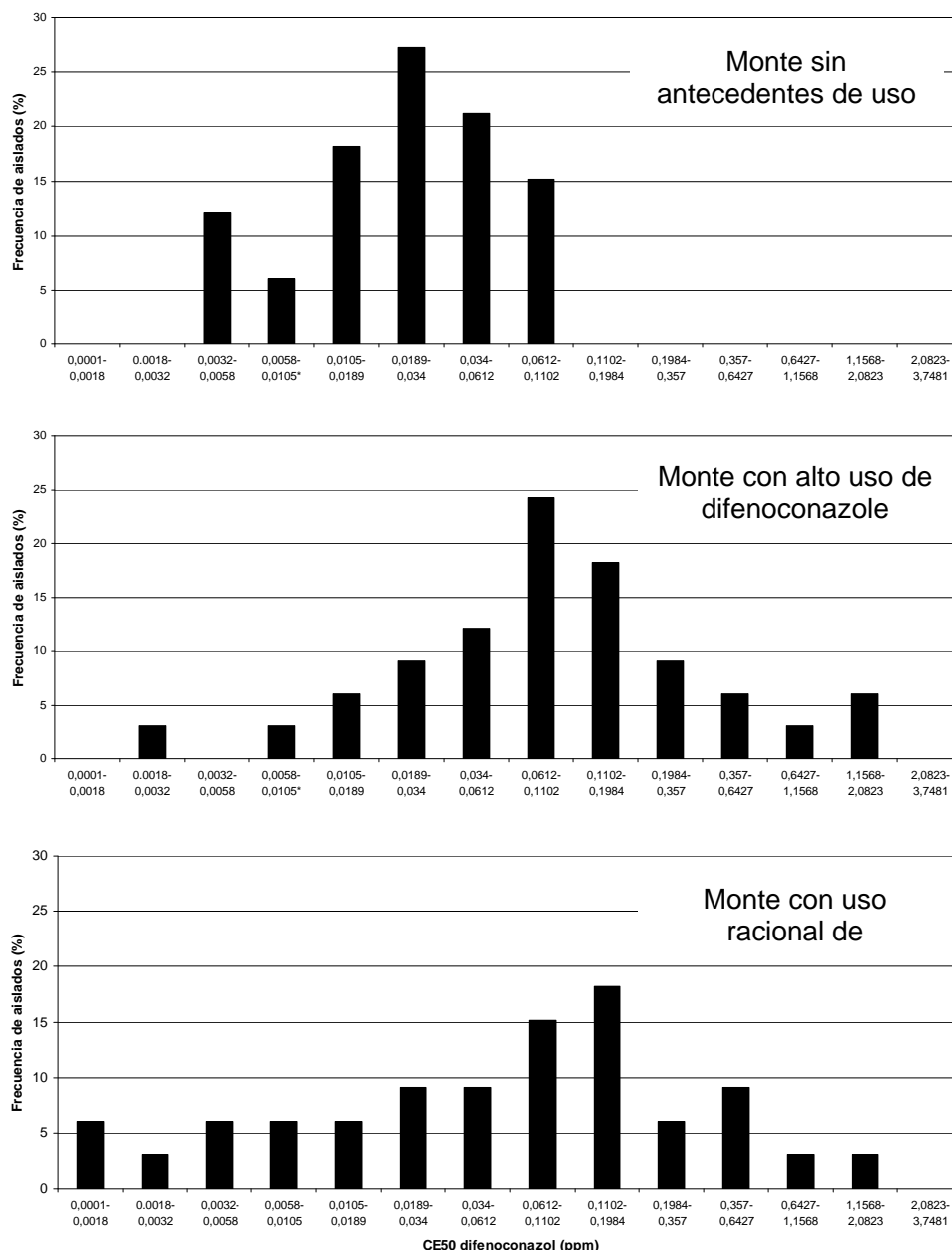


Figura 1 Concentraciones efectivas 50 de los aislados provenientes de tres montes. Como se puede apreciar en la Figura 1, en el monte sin antecedentes de aplicaciones de difenoconazole ningún aislamiento del hongo resistió concentraciones superiores a 0,11 partes por millón del fungicida. Mientras que en las poblaciones de *V. inaequalis* provenientes de montes con antecedentes de uso, algunos aislados tuvieron concentraciones efectivas 50 superiores a 2 ppm.

Estos valores de resistencia encontrados en las poblaciones expuestas al fungicida no significan que el difenoconazol haya perdido su eficacia completamente, pero sí son un llamado de alerta y pueden explicar algunas fallas registradas en el control de la sarna del manzano. Valores de resistencia similares a los obtenidos en Uruguay fueron encontrados en poblaciones chilenas de *V. inaequalis* (Henríquez et al, 2010).

Estrategias de manejo antirresistencia

La única manera segura de evitar el desarrollo de resistencia a fungicidas en las poblaciones de hongos fitopatógenos es evitar el uso de fungicidas de alto riesgo. Lo más parecido al NO uso de un fungicida es realizar una única aplicación por temporada. Por ello los fungicidas de alto riesgo de generar resistencia no deberían aplicarse más de una vez en el año. Lamentablemente la recomendación de limitar a 3 aplicaciones por temporada utilizada para el manejo anti-resistencia no fue capaz de evitar que estos fungicidas perdieran eficacia en el control de *V. inaequalis*. Esta situación no es exclusiva de Uruguay, una situación parecida se está encontrando en Chile (José Luis Hernández, com pers), en Brasil (Krueger, 2010) y en Michigan (Sundin et al, 2011b).

Frente a la situación de resistencia generalizada a estrobilurinas presente en diversas zonas productoras del mundo, la única recomendación posible es la de evitar completamente el uso de fungicidas de este grupo. Tal es la situación de Uruguay por lo que el manejo de preventivo de *V. inaequalis* deberá basarse en fungicidas del grupo de los ditiocarbamatos (mancozeb) o ftalamidas (captan).

Es necesario recordar que la resistencia encontrada a estrobilurinas es de tipo cualitativo, lo que significa que si el hongo posee la mutación del gen que le otorga resistencia se vuelve inmune al fungicida por lo que es capaz de resistir dosis extremadamente altas. Por lo tanto no tiene ningún efecto incrementar las dosis de aplicación en el campo.

En cuanto al uso de difenoconazole, la situación encontrada significa un alerta ya que se constata la pérdida de sensibilidad o aumento de la resistencia a este fungicida. Si bien estos resultados no impiden el uso de este fungicida nos obligan a ser muy precisos en el manejo. En este caso es posible mejorar la situación recurriendo a las dosis más altas recomendadas sin excederse de la máxima. Es posible también que el efecto retroactivo de 96 horas se encuentre disminuido, por lo que habrá que aplicarlo en las primeras horas posinfección.

Situaciones de resistencia generalizada a fungicidas del grupo de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol se han reportado en otras zonas productoras de manzana como es el caso de Michigan (Sundin et al, 2011a).

La principal estrategia para evitar que este problema se agudice es minimizar el uso de este fungicida. Para ello se debe evitar la ocurrencia de periodos de infección sin la protección de fungicidas de contacto. La mejor manera de evitar aplicaciones curativas es protegiendo a la planta con fungicidas de contacto (mancozeb, captan) aplicados en las horas previas a cada periodo de infección. Para esto es muy importante utilizar la información de los pronósticos meteorológicos de forma de que la aplicación se anticipe a la ocurrencia de lluvias.

Es indispensable disponer de la logística necesaria (tractores, atomizadoras y personal suficientes) para realizar estas aplicaciones en pocas horas, siendo el ideal que la aplicación se realice en las 24 a 48 hs previas a la ocurrencia de lluvias. Si este manejo preventivo se realiza correctamente será posible minimizar, e incluso evitar, el uso de fungicidas de alto riesgo de generar resistencia. Esto debe realizarse durante todo el periodo de liberación de ascosporas, desde la brotación de los manzanos hasta mediados de diciembre.

Bibliografía

Alaniz, S.; Leoni, C.; Mondino, P. 2003. Manejo de la sarna del manzano sin aplicaciones de fungicidas durante el verano. En : Producción Integrada en Uruguay: Claves de un sistema amigable con el medio ambiente que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad. PREDEG/GTZ Montevideo p127- 130.

Bartlett, D.W.; Clough, J.M.; Godwin, J.R.; Hall, A.A.; Hamer, M.; Parr Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manage. Sci.* 58:7:649-662.

Broniarek-Niemiec, A.; Bielenin, A. 2008. Resistance of *Venturia inaequalis* to strobilurin and dodine fungicides in Polish apple orchards. *Žemdirbystės Agric.* 95:366-372.

Damicone, J.; Smith, D. 2009. Fungicide Resistance Management. Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets. EPP-7663. 8p.

García, S.; Moscardi, C. 1981 El Sistema de Alarma para el Control de la Sarna del Manzano. Centro de Investigaciones Agrícolas Alberto Boerger. Estación Experimental Las Brujas. miscelanes N° 33

García, S.; Orrico, J.; Walasek, W. 1997. Control de sarna primaria en un programa de aplicaciones reducidas usando Kresoxim-metil. INIA Serie Actividades de Difusión 150:68-71.

Henríquez, J.L.; Sarmiento, O.; Alarcón, P. 2011. Sensitivity of *Venturia inaequalis* Chilean isolates to difenoconazole, fenarimol, mancozeb, and pyrimethanil. *Chilen.. J. Agr. Res.* 71:1: 39-44

Jobin, J.; Carisse, O. 2007. Incidence of myclobutanil- and kresoximmethyl- insensitive isolates of *Venturia inaequalis* in Quebec orchards. *Plant Dis.* 91:1351-1358.

Köller, W.; Wilcox, W.F.; Barnard, J.; Jones, A.L.; Braun, P. G. 1997. Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology* 87:184-190.

Krueger, R. 2010. Sarna da macieira: orientações ao controle para a safra 2010/2011. Aviso fitossanitário Nº 4. CIDASC São Joaquim.

Lesniak, K.E.; Proffer, T.J.; Beckerman, J.L.; Sundin, G.W. 2011. Occurrence of QoI resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Dis.* 95:927-934.

Mondino, P.; Alaniz, S. 2009. Manejo integrado de la sarna del manzano ocasionada por *Venturia inaequalis*. p. 35-43 En: Manejo Integrado de Doenças da Macieira. Stadnik, M. Editor. CCA-UFSC. Florianópolis.229p.

Mondino, P.; Alaniz, S.; Leoni, C. 2003. Racionalización y reducción del uso de fungicidas en el control de la sarna del manzano ocasionada por *Venturia Inaequalis*.. En: Producción Integrada en Uruguay: Claves de un sistema amigable con el medio ambiente que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad. PREDEG/GTZ Montevideo p119- 121

Sallato, B.V.; Latorre, B.A.; Aylwin G. 2006. First report of practical resistance to QoI fungicides in *Venturia inaequalis* (Apple scab) in Chile. *Plant Dis.* 90:375.

Slawewski, R.; Ryan, E.; Young, D. 2002. Novel Fungitoxicity assays for inhibition of germination-associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondite* spores. *Appl Env Microbiol* 68:597–601.

Stammler, G.; Klappach, K. 2006. Spore germination tests. QoI fungicides (on line) available in www.frac.info/frac/index.htm

Smith, F.D.; Parker, D.M.; Koller, W. 1991. Sensitivity distribution of *Venturia inaequalis* to the sterol demethylation inhibitor flusilazole: Baseline sensitivity and implication for resistance monitoring. *Phytopathology* 81:392-396.

Stevic, M.; Vuksa, P.; Elezovic, I. 2010. Resistance of *Venturia inaequalis* to dimethylation inhibiting (DMI) fungicides. *Zimberbisten = Agriculture* 97(4):65-72

Sundin, G.; Irish-Brown, A.; Proffer, T.J.; Lesniak, K. 2011a. Current status on resistance to sterol inhibitor fungicides in the apple scab fungus in Michigan. *Fruit Crop Advisory Team Alert* 25:2:2

Sundin, G.; Lesniak, K.; Proffer, T.J. 2011b. Update on resistance to strobilurin fungicides in the apple scab fungus in Michigan. *Fruit Crop Advisory Team Alert* 25:2:1-2

Vieira, F.J.P. 2009. Resistência de *Venturia inaequalis* a estrobilurinas na Cova da Beira. Dissertação de Mestrado. Castelo Branco : IPCB. ESA. 55 p.

Vincelli, P. 2002. QoI (Strobilurin) Fungicides: Benefits and Risks. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0809-02. Updated, 2007.

<http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/StrobilurinFungicides.aspx>

Ypema, H.L.; Gold, R.E. 1999. Kresoxim-methyl: modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Dis.* 83:4-19

Zheng, D.; Olaya, G.; Koller, W. 2000. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Current Opinion in Genetics and Development*, 35: 148–155.