

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO A DODINE
EN POBLACIONES DE *Venturia inaequalis*

por

María Julia CARBONE MARICHAL

TESIS presentada como uno
de los requisitos para obtener
el título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO

URUGUAY

2017

Tesis aprobada por:

Director:

Dr. Ing. Agr. Pedro Emilio Mondino Hintz

Dra. Ing. Agr. Sandra María Alaniz Ferro

Dra. Ing. Agr. Ana Elisa Silvera Pérez

Fecha: 21 de julio de 2017

Autor:

María Julia Carbone Marichal

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a mi hermano y a mi novio por el constante apoyo que me brindaron durante todo este proceso de formación.

Al Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino por brindarme su conocimiento, orientación y dedicación durante el desarrollo de este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio de Fitopatología por su ayuda e invaluable aliento, especialmente a la Lic. Laura Hernández.

A la Dra. Ing. Agr. Sandra Alaniz por sus aportes durante la realización de este trabajo.

Al Ing. Agr. Oscar Bentancour por su colaboración en los análisis estadísticos.

Al personal de documentación y biblioteca por su cordial atención, especialmente a la Lic. Sully Toledo por su dedicación en la corrección de este documento.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
2.1. PRODUCCIÓN DE MANZANAS.....	4
2.2. SARNA DEL MANZANO.....	5
2.2.1. <u>Agente causal</u>	5
2.2.2. <u>Síntomas</u>	5
2.2.3. <u>Ciclo de la enfermedad</u>	6
2.2.4. <u>Condiciones predisponentes para que se establezca la enfermedad</u>	8
2.2.4.1. Estadios susceptibles del manzano.....	8
2.2.4.2. Presencia de inóculo de sarna.....	9
2.2.4.3. Condiciones ambientales favorable.....	9
2.2.5. <u>Manejo de la sarna del manzano</u>	10
2.2.6. <u>Control químico de la sarna del manzano</u>	11
2.3. RESISTENCIA A FUNGICIDAS.....	17
2.3.1. <u>Riesgo de generar resistencia asociado al fungicida</u>	19
2.3.2. <u>Riesgo de generar resistencia asociado al patógeno</u>	20
2.3.3. <u>Resistencia de <i>Venturia inaequalis</i> a dodine</u>	20
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	23
3.1. MONTES SELECCIONADOS Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	23
3.2. OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS DE <i>V. inaequalis</i>	24
3.3. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE <i>V. inaequalis</i> AL FUNGICIDA DODINE.....	26
3.3.1. <u>Determinación de la concentración única de evaluación (CUE)</u>	26
3.3.2. <u>Ensayo de evaluación de la sensibilidad</u>	27
3.3.3. <u>Análisis estadístico</u>	27

4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	28
4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÚNICA DE EVALUACIÓN (CUE).....	28
4.2. SENSIBILIDAD DE POBLACIONES DE <i>V. inaequalis</i> A DODINE.....	30
5. <u>CONCLUSIONES</u>	36
6. <u>RESUMEN</u>	37
7. <u>SUMMARY</u>	38
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	39

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Superficie, número de plantas y producción según grupo de variedades, zafra 2016.....	4
2. Montes seleccionados según la historia de uso del dodine.....	23
3. Sensibilidad de poblaciones de <i>V. inaequalis</i> provenientes de siete montes con diferente historia de uso de dodine.....	30
4. Proporción de aislados de <i>V. inaequalis</i> con crecimientos relativos a la concentración única de evaluación mayores a 90% y 95%.....	33
Figura No.	
1. Ciclo de la sarna del manzano causada por <i>Venturia inaequalis</i> ..	7
2. Localización de los montes seleccionados.....	24
3. Esporas de <i>V. inaequalis</i> aisladas germinadas.....	25
4. Regresión lineal entre el $\text{Log}_{10}\text{CE}_{50}$ del fungicida dodine y el crecimiento relativo en porcentaje de los aislados seleccionados para cada concentración evaluada.....	29
5. Distribución de la sensibilidad de poblaciones de <i>V. inaequalis</i> a dodine.....	32
6. Crecimiento relativo de aislados de <i>V. inaequalis</i> a concentraciones crecientes de dodine.....	34

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del manzano (*Malus domestica* Borkh.) es uno de los cultivos de frutales de hoja caduca de mayor importancia en el mundo. En Uruguay, ocupa una superficie de 2677 ha, lo que representa el 49% del área ocupada por la fruticultura de hoja caduca, y aporta en promedio el 60% de la producción, lo cual lo convierte en el principal cultivo del rubro (MGAP. DIEA, 2016).

La enfermedad más importante que afecta a este cultivo es la sarna del manzano, causada por *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint., un hongo superior perteneciente a la subdivisión Ascomycotina. Está presente en todas las regiones de producción donde existen condiciones de humedad y de temperaturas frescas durante los meses de primavera. Afecta a todos los órganos verdes de la planta, pero los síntomas más evidentes son las manchas sobre las hojas y los frutos. El daño sobre los frutos es el de mayor relevancia en tanto que desmerece su calidad estética.

Debido a las características que presenta esta enfermedad y a las altas exigencias del mercado en cuanto a la calidad de los frutos, el control se realiza casi exclusivamente mediante la aplicación periódica de fungicidas. Actualmente, la mayoría de los productores nacionales desarrollan una estrategia de control químico preventiva basándose en los pronósticos meteorológicos, con aplicaciones de mancozeb y captan previo a la ocurrencia de las infecciones.

No obstante, dadas las características climáticas de la zona de producción de manzanas en nuestro país y a las dificultades que pueden tener los agricultores en sus predios para realizar las aplicaciones preventivas a tiempo, es común tener la necesidad de recurrir a aplicaciones de fungicidas con efecto retroactivo. Es decir, aplicaciones de fungicidas que tengan la capacidad de curar infecciones ya establecidas evitando la aparición de los síntomas.

Los fungicidas pertenecientes al grupo de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE) -los cuales aparecieron en el mercado a principio de la década de los 80- han sido los más efectivos para el control de *V. inaequalis* en aplicaciones postinfección, al punto que han desplazado al resto de los fungicidas usados anteriormente, como el dodine. Sin embargo, debido a que estos fungicidas tienen un sitio de acción específico ha aparecido resistencia en las poblaciones de *V. inaequalis* expuestas en diversas regiones del mundo y recientemente también en Uruguay (Mondino et al., 2015), por lo que las recomendaciones técnicas apuntan a minimizar su uso.

En este nuevo escenario, en el cual los fungicidas para el control postinfección son escasos, los productores han vuelto a considerar el uso de dodine como una alternativa importante para manejar esta enfermedad. El dodine

había comenzado a utilizarse como una herramienta altamente efectiva en el control de la sarna desde finales de los años 50, debido a que posee una excelente actividad protectora junto con efecto retroactivo de 48 horas (Rosenberger, 2011).

Según el Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), el dodine es considerado un fungicida de bajo a moderado riesgo de generar resistencia, a pesar de que su modo de acción es desconocido. No obstante, en el mundo existen numerosas publicaciones sobre la generación de poblaciones de *V. inaequalis* resistentes a este fungicida, señalando incluso que los niveles de resistencia persisten en las poblaciones aún después de 30 años de no aplicar el dodine (Carisse y Jobin, 2010).

Es necesario determinar cuál es el estado de situación actual en cuanto a la resistencia en las poblaciones de *V. inaequalis* a este principio activo. Hasta el momento no existen en Uruguay estudios publicados sobre el estatus de las poblaciones de *V. inaequalis* respecto al nivel de sensibilidad que presentan frente al dodine, solamente se dispone de la cita de Díaz (1997), que menciona la presencia de tolerancia leve.

Con ese único antecedente, si bien puede haber existido resistencia, no se sabe si esta ha perdurado en el tiempo a pesar de haber reducido el uso de dodine, o si fue a causa del menor uso del fungicida que la misma disminuyó. Por este motivo, en este trabajo se propuso evaluar la sensibilidad in vitro a dodine en poblaciones de *V. inaequalis* y asociarlo con la diferente historia de uso del fungicida.

Para esto, se seleccionaron siete montes de manzanos de la principal región de producción y de cada uno de ellos se obtuvieron muestras de 35 aislados monospóricos de *V. inaequalis*. La sensibilidad de los aislados a dodine se determinó mediante la evaluación del crecimiento relativo a una concentración única de evaluación respecto al crecimiento sin fungicida (Mondino et al., 2015).

1.1. OBJETIVO GENERAL

El principal objetivo del presente trabajo es generar conocimientos para un manejo integrado más eficiente de *Venturia inaequalis*, agente causal de la sarna del manzano.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1) Determinar la sensibilidad de diferentes poblaciones de *V. inaequalis* a dodine mediante la técnica de crecimiento relativo a una concentración única de evaluación.

2) Relacionar la sensibilidad de las poblaciones de *V. inaequalis* a dodine con la historia de uso de dicho fungicida.

3) Obtener colecciones de aislados monospóricos representativos de poblaciones de *V. inaequalis* con diferente historia de uso de dodine de la principal región de producción de manzanas de nuestro país.

4) Determinar una concentración única de evaluación (CUE) que permita determinar la sensibilidad de las poblaciones de *V. inaequalis* a dodine.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRODUCCIÓN DE MANZANAS

El cultivo del manzano (*Malus domestica* Borkh.) es uno de los principales cultivos de frutales de hoja caduca en el mundo. En el año 2013, la producción mundial fue de 80,8 millones de toneladas, correspondiente a una superficie de 5,2 millones de hectáreas (FAO, 2013).

El principal país productor es China, responsable del 49% de la producción mundial, y lo escolta Estados Unidos, con el 5%. Le siguen, en orden de importancia de volumen de producción, Turquía, Polonia, Italia, India, Francia, Chile, República Islámica del Irán y Federación de Rusia (FAO, 2013).

En Uruguay, el manzano es el principal cultivo de frutales de hoja caduca. Ocupa una superficie de 2677 ha, la cual representa el 49% del área total destinada a la fruticultura de hoja caduca, y el 60% de la producción del rubro (37.675 ton). La actividad es desarrollada por 472 productores (MGAP. DIEA, 2016).

La producción se concentra en la región sur del país, en los departamentos de Montevideo, Canelones y San José. Las principales variedades cultivadas pertenecen a los grupos varietales Red delicious tipo estándar y tipo spur (cuadro No. 1).

Cuadro No. 1. Superficie, número de plantas y producción según grupo de variedades, zafra 2016

Grupos varietales / variedades	Superficie ha	No. de plantas totales (miles)	% de plantas en producción	Volumen de producción %
Red delicious st. y spur	1624	1384	89,6	45
Gala	364	643	97,0	20
Granny Smith	310	282	97,2	17
Cripp's Pink	213	438	90,6	12
Fuji	78	130	97,7	4
Otras	88	97	100	2
Total	2677	2974	92,1	100

Fuente: adaptado de MGAP. DIEA (2016).

En cuanto a la comercialización, el principal destino es el mercado interno de fruta fresca. En la zafra 2016, el 85% del volumen total producido se destinó a dicho mercado, el 8,5% a la industria y el 6,2% a la exportación. Si bien los

volúmenes exportados siempre son muy bajos, las manzanas representaron cerca del 90% del total de las exportaciones del rubro fruticultura de hoja caduca (MGAP. DIEA, 2016).

2.2. SARNA DEL MANZANO

La sarna del manzano es la enfermedad más significativa que afecta a este cultivo, principalmente en las regiones de producción donde coexisten condiciones de humedad y de temperaturas frescas durante los meses de la primavera (nordeste de Norteamérica, Europa, América del Sur y Asia). Fue citada por primera vez en Suecia por Fries, en 1819 (Jones y Aldwinckle, 2002).

En Uruguay, las condiciones climáticas muy favorables a su desarrollo y los altos costos que insume su control, hacen que sea la enfermedad de mayor incidencia económica en el manejo de los cultivos de manzano (García y Moscardi, 1975).

2.2.1. Agente causal

El organismo causal de esta enfermedad es *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. (anamorfo *Spilocaea pomi* Fr.), hongo superior perteneciente a la subdivisión Ascomycotina, subclase Loculoascomycetidae, orden Pleosporales, familia Venturiaceae (Jones y Aldwinckle, 2002).

V. inaequalis produce pseudotecios con ascosporas bicelulares contenidas en ascas y conidios sobre conidióforos. Los pseudotecios se forman en hojas caídas en el suelo, presentan geotropismo negativo y su coloración varía de pardo oscuro a negro. Los conidios se producen en las manchas sobre la superficie de hojas y frutos en la planta, contienen una o dos células y son de color verde oliva (Jones y Aldwinckle, 2002).

2.2.2. Síntomas

La sarna puede afectar todos los órganos verdes de la planta (hojas, pecíolos, pedicelos, flores y frutos), pero los síntomas más visibles se producen sobre las hojas y los frutos (Jones y Aldwinckle, 2002).

En las hojas produce manchas que al comienzo presentan un color verde oliva claro y bordes indefinidos. Luego las manchas se oscurecen debido a la producción de conidios y los bordes se tornan más nítidos. Las manchas son más o menos redondeadas y de tamaño variable entre 3 a 10 mm (García y Moscardi 1975, Jones y Aldwinckle 2002).

El envés de las hojas es la primer parte expuesta por lo que es común encontrar los primeros síntomas ahí. Cuando las hojas se despliegan, ambas superficies quedan expuestas al ataque y pueden ser infectadas (Jones y Aldwinckle, 2002).

El número de manchas en las hojas depende de la gravedad del ataque, del estado de madurez del tejido y de la susceptibilidad de la variedad. Cuando las infecciones sobre las hojas jóvenes son numerosas, estas pueden llegar a deformarse (arrollarse, reducirse). Si el ataque es muy severo puede incluso producirse defoliación. Las infecciones que ocurren sobre pecíolos y pedicelos producen abscisión de hojas y frutos respectivamente (García y Moscardi 1975, Jones y Aldwinckle 2002).

Sobre los frutos jóvenes produce manchas similares a las de las hojas, las cuales luego se oscurecen debido a la esporulación y se encostran, pudiéndose agrietar. Toda la superficie del fruto es susceptible aunque las infecciones tempranas generalmente ocurren en la zona del cáliz, debido a que es la primera zona expuesta. Estas infecciones pueden afectar a los tejidos meristemáticos y producir deformaciones del fruto (Jones y Aldwinckle, 2002).

Cuando el fruto ya está desarrollado no causa agrietamiento ni deformaciones pero afecta su calidad estética. Se producen manchas de menor tamaño, negras y brillantes, que si no se evidencian previo a la cosecha (infecciones asintomáticas), lo hacen durante el almacenamiento en cámara de frío (García y Moscardi, 1975).

2.2.3. Ciclo de la enfermedad

La sarna del manzano es una enfermedad policíclica, es decir, pueden ocurrir varios ciclos de infección durante el ciclo del cultivo. En la figura No. 1 se ilustra el ciclo patológico.

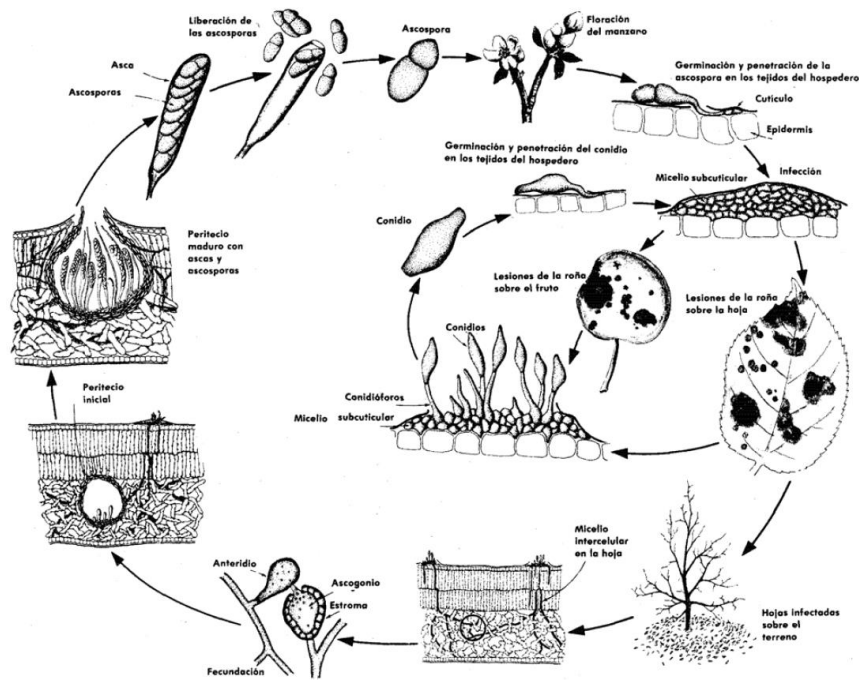


Figura No. 1. Ciclo de la sarna del manzano causada por *Venturia inaequalis* (Fuente: tomado de Agrios, 1995)

V. inaequalis inverna en forma de pseudotecios sobre las hojas caídas en el suelo (saprófito facultativo). Según MacHardy (1996) la formación de los pseudotecios comienza un mes después de la caída de hojas infectadas en el otoño, siendo la baja temperatura (4°C a 12°C) y la alta humedad relativa los factores ambientales que favorecen y determinan el número de cuerpos fructíferos formados.

En la primavera, coincidiendo con la brotación de los manzanos, comienza la liberación escalonada de ascosporas (inóculo primario), la cual se extiende hasta fines de noviembre o principio de diciembre (Mondino, 2003a).

La liberación de ascosporas sucede por un mecanismo de presión osmótica, para lo cual es necesaria la ocurrencia de precipitaciones. La mayoría de las ascosporas son liberadas en las horas de luz pero también se ha constatado liberación nocturna, de menor magnitud. Las ascosporas liberadas son arrastradas por corrientes de aire y depositadas sobre los tejidos susceptibles (MacHardy 1996, Martínez et al. 2014). Según García y Moscardi (1975) pueden ser arrastradas 300 metros o más, pudiendo así alcanzar plantaciones vecinas.

Para germinar e infectar las ascosporas requieren de un periodo de agua libre sobre los tejidos, el cual varía en función de la temperatura. Luego de ocurrida la infección el hongo coloniza subcuticularmente las hojas, y los

síntomas demoran en aparecer debido al largo tiempo de incubación que presenta esta enfermedad. A una temperatura promedio de entre 17 y 24°C los síntomas demoran en aparecer 9 días, mientras que a 9°C demoran 17 días (tabla de Mills, modificada por Jones, 2002).

Para que se produzca la esporulación de conidios (inóculo secundario), se requiere que la humedad relativa mínima sea de 60 a 70%. Los conidios, 100.000 o más en cada mancha foliar, son diseminados por el salpicado del agua de lluvia y por las corrientes de aire. Una vez que toman contacto con tejido susceptible y en presencia de una película de agua sobre la superficie generada por lluvia o por rocíos de larga duración, germinan y producen las infecciones secundarias (García 1998, Jones y Aldwinckle 2002, Mondino 2003a).

Dependiendo de las condiciones ambientales y de la susceptibilidad de los tejidos, pueden producirse varios ciclos secundarios durante la temporada. Después de la abscisión en el otoño, el hongo invade en profundidad las hojas las cuales son colonizadas saprofiticamente (Jones y Aldwinckle 2002, Mondino 2003a).

2.2.4. Condiciones para que se establezca la enfermedad

Según Agrios (1995) para que se desarrollen las enfermedades en las plantas deben estar presentes tres componentes: 1) la planta huésped en estado susceptible, 2) el patógeno virulento y en cantidad suficiente, y 3) el conjunto de condiciones ambientales dentro de límites favorables al proceso de desarrollo de la enfermedad.

2.2.4.1. Estadios susceptibles del manzano

Si bien todos los órganos verdes del manzano pueden ser afectados, los órganos más jóvenes son los más susceptibles. En este sentido, las hojas recién desplegadas y los frutos recién cuajados son los órganos más predispuestos a la infección.

Schwabe, citado por MacHardy (1996), demostró bajo condiciones experimentales que sobre hojas con más de 12 días de edad no se desarrollan manchas de sarna cuando son inoculadas con ascosporas, y que hojas inoculadas con conidios no presentan síntomas cuando tienen más de 17 días. Es decir, existe una susceptibilidad relativa a la edad de la hoja. A medida que ésta envejece se torna más resistente, fenómeno que se conoce como resistencia ontogénica.

En el caso de los frutos, Schwabe et al. (1984) demostraron que los requerimientos de periodo de mojado continuo de la superficie se incrementa a medida que los frutos crecen. Frutos con 10 semanas de edad desde plena flor y a 15°C de temperatura, requieren un mínimo de 24 horas de superficie mojada

para que se produzca la infección. A su vez, si el periodo de mojado se interrumpe tan solo una hora ya es suficiente para que se reduzca en 50% la cantidad de infección en frutos con 6 semanas de edad.

Por lo tanto, el periodo de mayor susceptibilidad de los frutos va desde plena flor hasta que éstos tienen pocos centímetros de desarrollo (15 días después de pétalo caído aproximadamente), en tanto que a medida que avanza la temporada es más difícil que se den las condiciones ambientales necesarias para que puedan ser infectados (Mondino, 2003a).

2.2.4.2. Presencia de inóculo de sarna

Las ascosporas se producen, como ya fue dicho, en los pseudotecios que se desarrollan en las hojas caídas en el suelo de la temporada anterior. Maduran en forma escalonada y se liberan cuando llueve, desde la brotación de los manzanos hasta fines de noviembre o principio de diciembre, con un pico máximo que coincide con la floración (de principios a mediados de octubre, MacHardy 1996, Mondino 2003a).

La Descarga Potencial de Ascosporas (DPA) estima el inóculo presente durante la primavera en el monte, en función del nivel de sarna secundaria del año anterior (Cooley, citado por Mondino y Alaniz, 2003b). En Uruguay, las condiciones de lluvias y periodos prolongados de humedad durante todo el año favorecen que se desarrollen numerosos ciclos de infecciones secundarias mientras exista tejido verde susceptible en la planta. Por lo tanto, es muy baja la probabilidad de encontrar montes con bajos niveles de sarna en hoja en otoño, lo que determina que el potencial de inóculo primario para la temporada siguiente usualmente sea alto (Mondino y Alaniz, 2003b).

A su vez, si se establecen infecciones primarias en el monte desde las primeras etapas del crecimiento vegetativo y cuajado de los frutos, las infecciones secundarias se superpondrán con las primarias, aumentando así la presión de inóculo.

2.2.4.3. Condiciones ambientales favorables

Para que se establezca la enfermedad deben darse las condiciones ambientales necesarias para que se liberen las ascosporas, y para que éstas puedan germinar y penetrar.

Como ya fue mencionado, para que se liberen las ascosporas es imprescindible la ocurrencia de lluvias y para que infecten se necesita de un mínimo de tiempo de agua libre sobre la superficie, que varía en función de la temperatura. Según la tabla elaborada por Mills, modificada por Jones y Aldwinckle (2002), con una temperatura entre 16,1 y 23,9°C son necesarias 9 horas de hoja mojada para que ocurra una infección ligera (contabilizadas a partir

del inicio de la lluvia), mientras que por encima de 26°C es poco frecuente que se produzcan infecciones (Jones y Aldwinckle, 2002).

2.2.5. Manejo de la sarna del manzano

Por tratarse de una enfermedad que afecta a los frutos desmereciendo su calidad estética, no se admiten económicamente pérdidas que superen el 3 a 5% de la fruta cosechada. Por este motivo, y teniendo en cuenta las condiciones ambientales tan favorables durante la primavera en la mayoría de los años para que se desarrolle la enfermedad (primaveras lluviosas y con temperaturas frescas), las medidas de manejo apuntan a evitar el establecimiento de la sarna primaria (infecciones por ascosporas), evitando que la epidemia ingrese en la fase de desarrollo exponencial (García, 1998).

Con este objetivo, el control de la sarna del manzano en nuestras condiciones de producción se realiza inevitablemente mediante el uso de fungicidas. Otras medidas de manejo como prácticas culturales solo sirven de apoyo al control químico, en tanto que por sí solas no son capaces de controlar eficientemente la enfermedad.

Según García (1998) algunas prácticas que resultan útiles en el manejo de la enfermedad son: 1) prácticas de poda que permitan tener un follaje abierto, favoreciendo la circulación de aire y penetración de la luz para disminuir el tiempo de mojado de la superficie foliar y de los frutos, y a su vez mejorar la eficiencia de las pulverizaciones; 2) correcta calibración de la máquina de aplicación, para lograr una óptima cobertura de todas las partes del árbol a la dosis correcta; 3) eliminación de plantaciones abandonadas, para reducir el número de ascosporas que eventualmente podrían ingresar a los montes en producción; y 4) mantenimiento del empastado de la fila. Esta última medida se sugiere en tanto que se ha comprobado en el extranjero que los pastos actúan “atrapando” las ascosporas que son liberadas desde las hojas en el suelo.

Por otra parte, si bien existen en el mundo cultivares resistentes a la sarna del manzano, éstos han tenido una limitada aceptación por parte de los productores y consumidores, debido a aspectos de calidad fisiológica y organoléptica (MacHardy, Merwin et al., citados por Cox, 2015).

En Uruguay, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Las Brujas), en el año 1985 liberó el primer cultivar resistente a sarna, denominado Prima. Dicho cultivar no logró prácticamente difusión debido a que no cumplió con los requerimientos de calidad exigidos por el mercado, y por otra parte, a que quebró la resistencia cuando era aún muy reciente su difusión en el Hemisferio Norte. Recientemente, en el año 2007, luego de ocho años de evaluación, INIA liberó la variedad Condessa, un cultivar de cosecha temprana y resistente a

sarna, pero que aún no ha alcanzado gran difusión entre los productores (Soria y Pisano, 2009).

2.2.6. Control químico de la sarna del manzano

La sarna del manzano se puede controlar mediante diferentes estrategias o combinación de las mismas. Al igual que cualquier otra enfermedad fúngica, es posible prevenir las infecciones utilizando fungicidas de contacto, los cuales deben ser aplicados antes de la ocurrencia de períodos de infección. Una vez ocurridas las infecciones, y debido a que *V. inaequalis* es un patógeno de lento crecimiento y a que la enfermedad presenta un largo período de incubación (9 a 17 días), es posible realizar aplicaciones curativas de fungicidas que penetran al tejido vegetal, evitando la aparición de los síntomas.

A esta capacidad de los fungicidas de controlar infecciones ya establecidas evitando la aparición de los síntomas se le denomina efecto retroactivo. El efecto retroactivo de los diferentes principios activos utilizados para el control de *V. inaequalis* varía de un grupo químico a otro, destacándose los fungicidas pertenecientes al grupo de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol los cuales poseen el máximo efecto retroactivo que es de 96 horas.

Pasado un período de 96 horas de ocurridas las infecciones de *V. inaequalis* ya no es posible evitar la aparición de los síntomas de la enfermedad pero sí se puede matar al hongo con estos mismos fungicidas, evitando que sobre las manchas se produzca inóculo secundario. Los síntomas que se desarrollan luego de realizadas estas aplicaciones se denominan manchas curadas presíntomas. Estas son manchas cloróticas que no presentan esporulación del hongo. Del mismo modo, si los síntomas típicos ya se han desarrollado, es posible curar las infecciones en cuyo caso las manchas adquieren el aspecto de manchas necróticas y se denominan manchas curadas postsíntomas (Mondino y Alaniz 2009, Alaniz et al. 2016).

En los inicios, por 1887, el único fungicida disponible era el caldo bordelés (una mezcla de sulfato de cobre y cal hidratada en agua). Su uso fue limitado en el tiempo, debido a sus efectos fitotóxicos que rápidamente se hicieron visibles sobre el manzano, en tanto que quema los tejidos verdes y causa roñado de los frutos. En principio las dosis fueron reducidas, hasta que, basados en algunas recomendaciones técnicas, se comenzó a sugerir su sustitución por el nuevo fungicida que apareció en el mercado: la mezcla sulfocálcica (polisulfuros de calcio).

A principios del siglo XX la mezcla sulfocálcica ya se empezaba a utilizar para el control de la sarna del manzano en California (Tweedy, citado por Holb et al., 2003), a pesar de que también causa fitotoxicidad en los frutos, especialmente

cuando se aplica sobre frutos pequeños y en días con alta humedad relativa (Holb et al., 2003).

Posteriormente, en la década del 1940, aparecieron los fungicidas orgánicos dando comienzo a la era de los fungicidas sintéticos (Cox, 2015). Desde entonces, el mancozeb y el captan ocupan un rol central en el manejo preventivo de la sarna del manzano. Son fungicidas de contacto que actúan en múltiples sitios de acción, por lo que a pesar de haber sido utilizados por más de 70 años, *V. inaequalis* no ha desarrollado resistencia a ellos. A su vez, no causan fitotoxicidad en la fruta, por lo que pueden ser aplicados en todos los estadios fenológicos y en diversas condiciones ambientales.

En Uruguay, con esos nuevos fungicidas disponibles, el control comenzó a realizarse mediante un sistema de aplicaciones periódicas, de mancozeb o captan, desde el inicio de la brotación hasta la cosecha (Carbonell et al., 1975). Con el objetivo de mantener el cultivo permanentemente cubierto, los tratamientos comenzaban a fin de punta plateada-comienzo de punta verde y se continuaban con una frecuencia de 5 a 7 días hasta la floración y de 10 a 14 días de floración en adelante, realizando en total más de 17 aplicaciones en promedio durante cada temporada (Carbonel et al. 1975, García 1998).

Más adelante, en la década del 60 y 70, la introducción de fungicidas sistémicos como el dodine y el benomyl, de 48 y 24 a 36 horas de efecto retroactivo respectivamente (Rosenberger, 2011), y la incorporación de datos epidemiológicos al publicarse los estudios realizados por Mills, citado por MacHardy y Gadoury (1989), permitieron cambiar drásticamente el manejo de *V. inaequalis*. Con estos fungicidas era posible curar infecciones ya establecidas cuando mediante el esquema de aplicaciones periódicas no se lograba prevenirlas (Carbonel et al. 1975, García y Moscardi 1981, García 1998, Mondino y Alaniz 2009).

En nuestro país, con el fin de racionalizar las aplicaciones de fungicidas para el control de *V. inaequalis*, en 1975 se desarrolló el Sistema de Alarma para las principales zonas productoras, Melilla y Joanicó. El Sistema de Alarma es un servicio brindado a los productores, en sus inicios por el Centro de Investigaciones Agrícolas Alberto Boerger (CIAAB) y en la actualidad por la Dirección General de Servicios Agrícolas del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Este sistema informa a los agricultores de la ocurrencia de períodos de infección, en función de los registros de las precipitaciones, de las horas de hoja mojada en tiempo real, de la temperatura y de la presencia de ascosporas maduras de *V. inaequalis* (García y Moscardi 1981, García 1998).

El Sistema de Alarma pretendía un cambio en la estrategia de manejo de esta enfermedad. Los agricultores ahora contarían con la información precisa de la ocurrencia de un período de infección y podrían desarrollar una estrategia de

manejo exclusivamente curativa, con la cual en lugar de realizar aplicaciones semanales de fungicidas, solo aplicarían cuando se confirmara la ocurrencia de las infecciones, pudiendo reducir así el número de aplicaciones por temporada.

Así es que en el año 1981 se difunden resultados de investigación que muestran una reducción considerable en el número de pulverizaciones cuando se implementa la estrategia de aplicaciones curativas en base a la información del Sistema de Alarma. Los fungicidas con actividad postinfección recomendados según el esquema propuesto por la estrategia curativa basada en el Sistema de Alarma eran el dodine, el benomyl, el metil tiofanato y la mezcla sulfocálcica (García y Moscardi, 1981).

Sin embargo, una de las principales dificultades prácticas que presentó este esquema de manejo fue que durante la primavera suelen ocurrir varios días de lluvias seguidos por más de un día de viento, por lo que muchas veces resulta imposible realizar las aplicaciones curativas a tiempo, lo que lleva a un control ineficiente (García, 1998).

Por esta razón, en la práctica no se abandonó la estrategia preventiva en base a la aplicación periódica de fungicidas de contacto, sino que ésta fue reforzada con la incorporación de aplicaciones curativas de fungicidas penetrantes. De todos modos, con la información precisa de la ocurrencia de un período de infección, los productores podrían restringir el uso de fungicidas con actividad postinfección aplicando solamente cuando se confirmara el período de infección y sus montes no se encontrasen protegidos por una aplicación previa de un fungicida de contacto.

No obstante, en la práctica esto tampoco ocurrió ya que los productores adoptaron el criterio de aplicar fungicidas cada vez que el Sistema de Alarma comunicaba la ocurrencia de un período de infección, sin considerar si sus montes estaban o no protegidos por aplicaciones preventivas. Esto condujo a un uso excesivo de fungicidas para el control de la enfermedad.

El uso excesivo de fungicidas tiene efectos secundarios negativos tanto para el medio ambiente como para la salud de aplicadores y consumidores, además de lo costoso que resulta. A esto se suma que los fungicidas utilizados en las aplicaciones curativas se caracterizan por su alto riesgo de generar resistencia, y la pérdida de efectividad de algunos de ellos fue comunicada. Tal es el caso del dodine y de los benzimidazoles (Cox, 2015).

El dodine ha sido utilizado para el control de *V. inaequalis* desde fines de la década del 50. En el año 1969, después de casi una década de intenso uso, Szkolnik y Gilpatrick publicaron por primera vez la aparición de resistencia en poblaciones de *V. inaequalis* al dodine en Nueva York. A partir de entonces existen en el mundo numerosas publicaciones sobre la generación de

poblaciones de *V. inaequalis* resistentes a este fungicida (Ross y Newbery 1977, Sholberg et al. 1989, Köller et al. 1999, Meszka et al. 2008, Broniarek-Niemiec y Bielenin 2008, Carisse y Jobin 2010).

Los benzimidazoles comenzaron a utilizarse para el control de *V. inaequalis* en los años 70, y 5 años después ya fue publicada la aparición de resistencia en Michigan (Jones y Walker, citados por Cox, 2015). Pocos años después se constató resistencia en las poblaciones de *V. inaequalis* en Nueva York (Katan et al., 1983), y más adelante en otras regiones, por lo que su uso rápidamente dejó de ser recomendado (Cox, 2015).

Afortunadamente, coincidiendo con la aparición de resistencia a benomyl y a dodine, a principios de la década del 80 aparecieron en el mercado los primeros fungicidas pertenecientes al grupo de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE). Estos fungicidas desplazaron rápidamente al benomyl y al dodine, no solamente por causa de la pérdida de efectividad de éstos debida a la resistencia, sino también porque los nuevos fungicidas IBE poseían un mayor efecto retroactivo (96 horas) lo que facilitaba el manejo de la enfermedad.

Más recientemente, en 1996, aparecieron en Europa los fungicidas kresoxim-methyl y trifloxystrobin, pertenecientes a un nuevo grupo, las estrobirulinas. Estos fungicidas se integraron a la estrategia de manejo preventiva junto al mancozeb y al captan. A diferencia de estos, las estrobirulinas son fungicidas de sitio de acción específico por lo que presentan alto riesgo de generar resistencia. A pesar de haber sido comercializadas con la recomendación de no realizar más de cuatro aplicaciones por temporada para evitar el desarrollo de resistencia (García et al., 1997), la resistencia a estos fungicidas no tardó en aparecer (Olaya y Köller 1999, Köller et al. 2005, Broniarek-Niemiec y Bielenin 2008, Mondino et al. 2015).

A comienzos del siglo XXI, en Uruguay, investigaciones realizadas por la Facultad de Agronomía y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) demostraron que es posible eliminar las aplicaciones de fungicidas para el control de *V. inaequalis* durante el verano. La eliminación de las aplicaciones de fungicidas a partir del 15 de diciembre hasta la cosecha significó un avance importante en el manejo de la enfermedad, reduciéndose entre cuatro y cinco el número de aplicaciones en cada temporada (Alaniz et al., 2014).

Como ya fue mencionado, la estrategia de aplicaciones periódicas de fungicidas de contacto presentaba fallas en el control. Estas fallas se deben a que no se consideraba la pérdida de residualidad de los fungicidas a medida de que pasan las horas y días luego de aplicados, motivo por el cual si las condiciones para la infección ocurrían en los días finales del período entre aplicaciones, los cultivos ya no estaban suficientemente protegidos. Una manera de evitar estas fallas es realizar las aplicaciones preventivas uno o dos días antes

de la ocurrencia del período de infección, teniendo en cuenta los pronósticos meteorológicos.

En la actualidad, con el propósito de maximizar la eficiencia de los productos aplicados, evitar o retardar la aparición de resistencia en la población del patógeno a los fungicidas con actividad postinfección, y minimizar efectos secundarios sobre la salud de aplicadores, consumidores y sobre el medio ambiente, la estrategia de control químico utilizada se define como una “estrategia preventiva en función de los pronósticos meteorológicos” (Mondino y Alaniz, 2009).

Esta estrategia consiste en prevenir las infecciones aplicando fungicidas de contacto dentro de las 48 a 24 horas previas al inicio de la lluvia, y recurrir a las aplicaciones curativas de fungicidas solo cuando por alguna razón no fue posible prevenir la infección. La disponibilidad de pronósticos meteorológicos más precisos ha facilitado la implementación de dicha estrategia (Mondino y Alaniz, 2009). Los fungicidas de contacto utilizados para prevenir las infecciones de *V. inaequalis* siguen siendo el mancozeb y el captan.

Las desventajas que se pueden señalar de ésta estrategia son de índole práctico. Es necesario que el productor tenga correctamente dimensionada la maquinaria para poder realizar a tiempo las aplicaciones cuando se pronostican lluvias, previendo a su vez que la planta se seque antes de que comience a llover. Además, se debe disponer de mano de obra para realizar las aplicaciones, aún si fuera necesario hacerlas en días no laborables (fines de semana o feriados). Por otra parte, algunos de los insecticidas que se utilizan para el control de la carpocapsa (*Cydia pomonella*) no pueden ser aplicados previo a la lluvia, por lo que debe ajustarse la estrategia de manejo de insectos si se pretende evitar tener que duplicar aplicaciones.

Debido a las características climáticas de nuestro país, donde ocurren primaveras lluviosas en las cuales dichos eventos pueden durar varios días, y a las múltiples dificultades que pueden presentarse en cada establecimiento para realizar las aplicaciones preventivas a tiempo, inevitablemente los agricultores se ven en la necesidad de realizar aplicaciones postinfección, más de una vez por temporada.

Por lo tanto, la posibilidad de utilizar fungicidas con efecto retroactivo constituye una herramienta fundamental para el manejo de esta enfermedad. Los fungicidas que se utilizan para el control postinfección de *V. inaequalis* en el presente son los IBE, el dodine y la mezcla sulfocálcica.

Los IBE son fungicidas sistémicos que actúan inhibiendo la enzima esterol C14-demitalasa, la cual cataliza la demetilación del C14 en la síntesis del ergosterol. Son los fungicidas más eficientes para el control postinfección de *V.*

inaequalis dado que poseen hasta 96 horas de efecto retroactivo, motivo por el cual, como ya se mencionó, una vez que aparecieron en el mercado a principio de la década de los 80 desplazaron a los fungicidas penetrantes que se usaban con anterioridad.

Sin embargo, debido a que los IBE actúan en un sitio de acción específico, se ha desarrollado resistencia en las poblaciones de *V. inaequalis* expuestas en diversas regiones del mundo (Köller et al. 1997, Jobin y Carisse 2007, Stevic et al. 2010, Chapman et al. 2011, Pfeufer y Ngugi 2012), y recientemente también en Uruguay (Mondino et al., 2015), por lo que las recomendaciones técnicas apuntan a minimizar su uso.

Dado este nuevo escenario, en el cual el uso de los IBE debe restringirse para evitar o retardar la aparición de resistencia práctica, la cual ya se ha constatado en diversas regiones de producción de manzanas en el mundo (Köller et al., 1997), los agricultores han vuelto a considerar al dodine como una herramienta alternativa importante para manejar esta enfermedad.

El dodine es un fungicida de contacto y con acción translaminar que actúa a nivel de la membrana celular, pero el modo de acción es desconocido (FRAC, 2017). Posee excelente actividad protectora, efecto retroactivo de 48 horas y acción antiesporulante en aplicaciones postsíntomas (Rosenberger, 2011). No se recomienda su aplicación sobre frutos pequeños porque les produce roñado, especialmente en variedades sensibles y cuando es aplicado con temperaturas bajas.

Como ya fue mencionado, en varios países ha sido publicada la aparición de resistencia a dodine en poblaciones de *V. inaequalis* (Ross y Newbery 1977, Sholberg et al. 1989, Köller et al. 1999, Meszka et al. 2008, Broniarek-Niemiec y Bielenin 2008, Carisse y Jobin 2010), pero hasta el momento no existen en Uruguay estudios realizados al respecto.

La mezcla sulfocálcica (polisulfuros de calcio) por su parte, que en la actualidad su uso se restringe a curar infecciones ya establecidas, es un fungicida de contacto, que posee actividad protectora, efecto retroactivo de hasta 72 horas y acción antiesporulante en aplicaciones postsíntomas. El sulfuro de hidrógeno inhibe la respiración, afecta proteínas y forma quelatos con metales pesados en la célula fúngica. Debido a que actúa en múltiples sitios de acción las poblaciones de *V. inaequalis* no han desarrollado resistencia a este fungicida, a pesar de haber sido expuestas por más de 100 años. Sin embargo su uso es limitado en tanto que posee alto riesgo de causar fitotoxicidad en las hojas y en los frutos, especialmente cuando se aplica sobre frutos pequeños y con alta humedad relativa. A su vez, afecta el ecosistema, pudiendo causar efectos adversos sobre enemigos naturales (Holb et al., 2003).

2.3. RESISTENCIA A FUNGICIDAS

Si bien la aplicación de fungicidas es la herramienta más efectiva utilizada para el control de la sarna del manzano, en ocasiones ocurren fallas en el control. Estas fallas pueden deberse a varios factores como incorrecta elección del fungicida (elección de un fungicida no efectivo para controlar *V. inaequalis*), aplicación a destiempo (mancozeb, un fungicida que es efectivo si se aplica preventivamente, usado luego de ocurridas las infecciones), errores en la aplicación (errores al calcular la dosis), mala cobertura de la planta (debido al mal funcionamiento de la maquinaria o aplicación con viento), o a la aparición de cepas del patógeno resistentes al fungicida.

Según el Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), el término “resistencia a un fungicida” refiere a la disminución de la sensibilidad de un hongo frente a un fungicida específico, siendo esta una característica adquirida y heredable en la población. Generalmente aparece como resultado de una reiterada exposición de la población patógena a dicho agente antifúngico, o a otro de igual sitio de acción (Brent y Hollomon, 2007b).

Existen cuatro mecanismos principales por los cuales los hongos pueden volverse resistentes a los fungicidas (Ma y Michailides, 2005). Por un lado, la resistencia puede deberse a una alteración del sitio de acción del fungicida, lo que impide que éste pueda unirse y alterar la vía metabólica en cuestión. Por otro lado, la resistencia puede estar explicada por el hecho de que el hongo active mecanismos de detoxificación, modificando a través del metabolismo celular al fungicida a formas no tóxicas o inactivas.

Otro mecanismo es la sobreexpresión del sitio de acción. El fungicida al ingresar a la célula compite con el sustrato enzimático natural del sitio de acción. Cuanto mayor es la concentración intracelular del fungicida, mayor es la probabilidad de que éste se una a los sitios de acción, desplazando de este modo al sustrato verdadero, y obstruyendo el proceso metabólico implicado. Sin embargo, cuando el hongo produce sitios de acción adicionales y la concentración de fungicida se mantiene estable, la probabilidad de que el sustrato enzimático verdadero se una a los sitios de acción aumenta, garantizando entonces que los procesos celulares se lleven a cabo.

Por último, el cuarto mecanismo de resistencia posible es la exclusión o expulsión del fungicida desde los sitios de acción. Naturalmente en las células existen mecanismos de eliminación de sustancias extrañas o exportación de sustancias endógenas a través de las bombas de eflujo. Pero a pesar de la existencia de estos mecanismos, la mayoría de los fungicidas logran alcanzar concentraciones intracelulares nocivas que impiden el desarrollo normal de los procesos metabólicos. En ocasiones los mecanismos de eflujo de las células

fúngicas logran ser eficientes en la eliminación de las moléculas del fungicida, lo que le confiere al hongo pérdida de sensibilidad a dicho fungicida.

De acuerdo a Vero et al. (2009), desde el punto de vista molecular, estos mecanismos de resistencia aparecen como resultado de mutaciones, es decir de cambios en el material genético del patógeno. Estas mutaciones pueden ser puntuales o de mayor extensión, y a su vez, pueden ocurrir en un solo gen del patógeno o en varios. En general, cuando la mutación ocurre en un solo gen (monogénica), la resistencia se conoce como cualitativa, mientras que cuando las mutaciones involucran varios genes del patógeno (poligénica), la resistencia es de tipo cuantitativa.

Cuando la resistencia es de tipo cualitativa (o discreta), la población del patógeno se divide en individuos de mayor o menor sensibilidad al fungicida, no hay individuos con sensibilidades intermedias. En general, se trata de mutaciones que provocan una alteración en el sitio blanco de acción del fungicida. Por ejemplo, la resistencia de *V. inaequalis* a estrobirulinas, se debe a una mutación puntual en el gen mitocondrial correspondiente al citocromo b, lo que provoca una sustitución del aminoácido de la posición 143, alterándose así el sitio de acción (Grasso et al., citados por Vero et al., 2009).

En cambio, cuando la resistencia es de tipo cuantitativa (o continua), la población se compone de individuos que presentan diferencias graduales en el nivel de sensibilidad. A diferencia de la cualitativa, la resistencia de tipo cuantitativa se debe a una acumulación de mutaciones, lo cual se ha visto asociado con la reducción de la concentración intracelular del fungicida, al uso de vías alternativas a las afectadas por el fungicida y a la sobreexpresión de las moléculas del sitio de acción (Ochiai et al., Deising et al., citados por Vero et al., 2009).

A modo de ejemplo, se ha encontrado que la resistencia de *V. inaequalis* a fungicidas pertenecientes al grupo de los IBEs es consecuencia de la sobreexpresión del gen CYP51, debido a la presencia de una inserción de 553pb en la región promotora del gen (Schnabel y Jones, citados por Vero et al., 2009).

A su vez, un individuo portador de mutaciones que le confieren resistencia a un determinado fungicida, presenta una ventaja competitiva frente a los individuos sensibles cuando ambos son expuestos a dicho agente antifúngico. Es por eso que la aplicación reiterada del fungicida provoca cambios en la población total, haciendo que prevalezcan los individuos resistentes mientras que los sensibles tienden a desaparecer. Este fenómeno se conoce como presión de selección a favor de la subpoblación resistente, y es el que determina que la disminución de la sensibilidad se convierta en una condición poblacional (Vero et al., 2009).

2.3.1. Riesgo de generar resistencia asociado al fungicida

El riesgo que presenta un fungicida de desarrollar resistencia en una población de un patógeno puede ser previamente dilucidado considerando la clase química a la que pertenece, lo cual está estrechamente asociado al modo de acción que presenta.

El FRAC clasifica a los grupos químicos de fungicidas en alto, moderado y bajo riesgo de generar resistencia. Dentro de la categoría de alto riesgo se incluyen aquellos grupos químicos cuya efectividad ha decrecido severamente y en forma extendida en uno o más patógenos blanco, en ciertas regiones a los pocos años de su introducción. Los grupos químicos cuya efectividad ha disminuido en pocas situaciones o en extensión limitada, y/o que fueron encontrados pocos aislados resistentes de los patógenos, son clasificados como de riesgo moderado. Finalmente se consideran de bajo riesgo aquellos grupos para los cuales no ha sido constatada la disminución de la efectividad u ocurrencia de resistencia, o muy rara vez, incluso después de muchos años de uso (Brent y Hollomon, 2007a).

En los casos en los que se ha comprobado resistencia, el mecanismo más frecuentemente involucrado es la modificación bioquímica del sitio de acción del fungicida en el patógeno. Según Brent y Hollomon (2007a), muchos autores coinciden en que estas modificaciones son más factibles de ocurrir en un solo sitio de acción, en comparación con que ocurran en múltiples sitios de acción. Un simple sitio de acción puede ser modificado a través de un cambio de una base en el ADN (mutación puntual) que determine el cambio de un aminoácido en la proteína sitio de acción del fungicida, lo cual tiene una probabilidad de ocurrencia de 10^{-8} . Sin embargo, para que sean modificados al menos dos sitios de acción, es necesario que ocurran al menos dos mutaciones puntuales independientes en genes diferentes, lo cual tiene una probabilidad asociada de 10^{-16} .

En general, los fungicidas sistémicos son clasificados como de alto riesgo inherente de generar resistencia debido a que actúan en un sitio de acción específico. Por el contrario, la mayoría de los fungicidas de contacto actúan en múltiples sitios de acción, lo que les confiere bajo riesgo de desarrollar resistencia en las poblaciones de los patógenos. Es así que los fungicidas a base de cobre, las ftalamidas y los ditiocarbamatos nunca han desarrollado resistencia práctica, aún después de muchos años de uso, mientras que en otras clases de fungicidas como benzimidazoles, phenylamidas, dicarboximidas, estrobirulinas e IBEs, entre los 2 a 10 años de uso comercial ya fueron constatados casos de resistencia práctica (Brent y Hollomon, 2007a).

De acuerdo a FRAC (2017), el dodine es considerado un fungicida de bajo a moderado riesgo de generar resistencia, a pesar de que su modo de acción preciso es desconocido.

2.3.2. Riesgo de generar resistencia asociado al patógeno

En función de determinadas características biológicas y epidemiológicas, los patógenos pueden ser clasificados como de bajo, medio o alto riesgo de generar resistencia a un fungicida que sea utilizado para su control. Esta propiedad intrínseca de cada patógeno se conoce como riesgo inherente del patógeno a volverse resistente (Brent y Hollomon, 2007a).

Según Brent y Hollomon (2007a), los factores más importantes que determinan el riesgo inherente de un patógeno a generar resistencia son:

- Ciclo de vida del patógeno; cuanto menor es el tiempo entre cada generación, más frecuentemente es necesario aplicar fungicida para su control, y por lo tanto más presión de selección a favor de los individuos resistentes.
- Abundancia de esporulación; cuantas más esporas se produzcan, mayor disponibilidad de genomas individuales en los que pueden ocurrir mutaciones, y a su vez, mayor velocidad de propagación de los individuos mutantes resistentes.
- Capacidad de diseminación de las esporas, entre plantas, cultivos y regiones.
- Habilidad de infectar en distintas etapas del cultivo, lo que determina la necesidad de hacer tratamientos químicos en diferentes momentos.
- Ocurrencia de la forma sexual durante el ciclo de la enfermedad; esto puede favorecer o dificultar el desarrollo de la resistencia.
- Habilidad para expresar genes mutantes.

V. inaequalis es un patógeno clasificado por el FRAC como de alto riesgo inherente de generar resistencia, en tanto que reúne todas las características antes mencionadas (Brent y Hollomon, 2007a).

2.3.3. Resistencia de *Venturia inaequalis* a dodine

El dodine fue introducido en Estados Unidos como un potente fungicida con actividad postinfección para el control de la sarna del manzano hacia fines de la década de 1950. En el año 1968, después de casi una década de intenso uso, fueron observadas las primeras fallas en el control, y un año después, Szkolnik y Gilpatrick publican por primera vez la aparición de resistencia en poblaciones de *V. inaequalis* al dodine en Nueva York (Szkolnik y Gilpatrick 1969, Köller et al. 1999).

Investigaciones realizadas por Köller et al. (1999) en Michigan y Nueva York, revelan que en poblaciones de *V. inaequalis* dónde previamente se había confirmado resistencia, después de cuatro y 13 años de no uso del dodine respectivamente, los niveles de resistencia poblacionales habían disminuido pero

sin llegar a los niveles de sensibilidad de poblaciones que nunca fueron expuestas a dicho fungicida (sensibilidad de base). De todas maneras, una vez que el uso del dodine fue retomado, la proporción de individuos resistentes rápidamente volvió a incrementarse.

Ese descenso de la proporción de individuos resistentes a dodine en las poblaciones una vez que el fungicida dejó de usarse, sin alcanzar los niveles de sensibilidad existentes en las poblaciones nunca expuestas, podría estar explicado por el hecho de que el desarrollo de la resistencia de *V. inaequalis* a dodine es de tipo poligénica (Köller et al., 1999). Estudios realizados por Polach, citado por Crute (1992), indican que al menos 3 genes están involucrados en la resistencia de *V. inaequalis* a dodine, y sus efectos son aditivos.

En Polonia, el dodine fue introducido hacia finales de los años 60, y en 1990 fue detectado el primer caso de resistencia en *V. inaequalis* (Nowacka, citado por Meszka et al., 2008). A partir de entonces, en varias regiones de Polonia fueron publicados casos de resistencia, por lo que muchos de los productores dejaron de usar este fungicida. Estudios realizados por Broniarek-Niemiec y Bielenin (2008), Meszka et al. (2008), indican que los niveles de resistencia en las poblaciones de *V. inaequalis* persistieron a pesar de que el uso del dodine fue discontinuado, o solo ha sido utilizado una vez por temporada en los últimos años.

En este mismo sentido, en Canadá, en la región de Nova Scotia, después de casi 15 años de uso del dodine fueron observadas las primeras fallas en el control, y en 1977, estudios realizados por Ross y Newbery (1977) demostraron que los niveles de tolerancia de *V. inaequalis* a dodine eran mayores en poblaciones del patógeno que habían sido expuestas a dicho fungicida, en comparación con poblaciones nunca expuestas. Por otra parte, estudios realizados por Carisse y Jobin (2010), en Quebec, demostraron que en poblaciones de *V. inaequalis* que durante 30 años no fueron expuestas al dodine los niveles de resistencia eran mayores en relación con los niveles encontrados en poblaciones nunca expuestas, lo cual demuestra que los individuos resistentes persistieron en las poblaciones.

Dado que la resistencia a dodine es estable en los individuos de *V. inaequalis* (Carisse y Jobin, 2010), la disminución en los niveles de resistencia poblacionales registrados en Michigan y Nueva York una vez que el uso de dodine fue discontinuado (Köller et al., 1999), puede explicarse según Cox (2015) por una dilución en la proporción de individuos resistentes debido a fenómenos de selección por el uso de otros fungicidas, o también debido a que viejos montes de manzanos fueron abandonados y los nuevos cultivos se establecieron en áreas donde la resistencia de *V. inaequalis* a dodine no estaba aún establecida.

En Nueva Zelanda, por el contrario, estudios realizados por Bakker (1999), Beresford et al. (2012) muestran que desde la década del 90 las poblaciones de *V. inaequalis* no han perdido la sensibilidad al dodine, por lo que sigue siendo un fungicida efectivo. El no desarrollo de resistencia lo adjudican a la efectividad de las medidas de manejo antirresistencia recomendadas, y adoptadas por los productores, de no más de tres aplicaciones de dodine por temporada (Beresford et al., 2013).

En Uruguay, el único antecedente de evaluación de resistencia de *V. inaequalis* a dodine fue realizado en la Clínica de Diagnóstico del MGAP en 1991. En dicha oportunidad Díaz (1997) evaluó el porcentaje de germinación de conidios de *V. inaequalis* a dos concentraciones de dodine, y determinó que había cepas con tolerancia leve.

Si bien en nuestro país el dodine fue dejado de lado con la aparición de los IBE, una vez que fue observada la pérdida de efectividad de estos debido a la aparición de resistencia (Mondino et al., 2015), los productores han retomado su uso.

Para verificar si el uso del dodine es una medida eficiente para controlar la sarna del manzano en nuestro país es necesario determinar cuál es el estado de situación actual en cuanto a la resistencia en las poblaciones de *V. inaequalis* a este principio activo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MONTES SELECCIONADOS Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

En el otoño del año 2016 se seleccionaron siete montes de manzanos con diferente historia de uso de dodine. Un monte con tres o más aplicaciones por temporada, cuatro con una o dos aplicaciones por temporada, uno sin aplicación de dodine desde el 2011 y uno en el cual nunca se aplicó este fungicida (cuadro No. 2).

Los montes se localizan en la principal región de producción de manzanas del país, en las localidades de Melilla (Montevideo) y Las Brujas (Canelones, figura No. 2).

Cuadro No. 2. Montes seleccionados según la historia de uso de dodine

Monte	Variedad	Zona	Historial de uso de dodine
1	Cripp's Pink	Melilla	Sin uso
2	Early Red One	Melilla	Bajo uso ^a
3	Early Red One	Melilla	Bajo uso
4	Red Chief	Melilla	Bajo uso
5	Early Red One	Melilla	Bajo uso
6	Red Chief	Melilla	Alto uso ^b
7	-	Las Brujas	Sin uso desde 2011

^a Realiza una o dos aplicaciones por temporada de dodine

^b Realiza tres o más aplicaciones por temporada de dodine

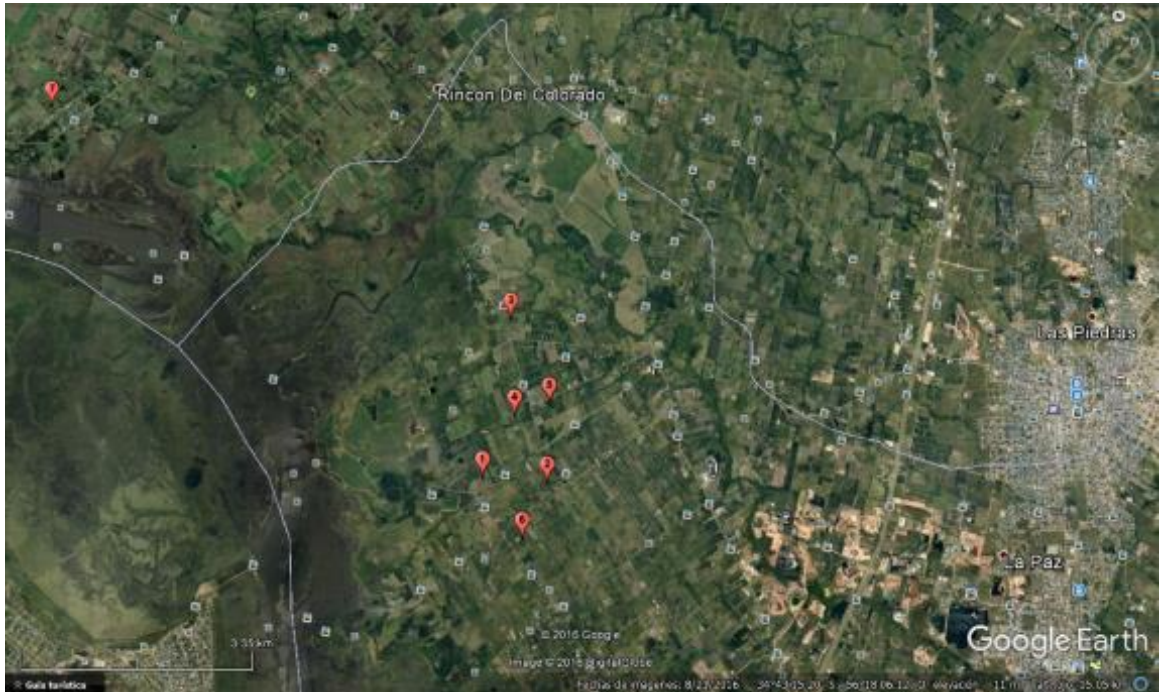


Figura No. 2. Localización de los montes seleccionados

De cada uno de los montes seleccionados se tomó una muestra compuesta por 35 hojas con síntoma de sarna, tomadas cada una de árboles distintos. La recolección de las muestras se hizo siguiendo una trayectoria zigzagueante dentro de cada monte, abarcando toda la superficie del mismo.

El muestreo se realizó en los meses de marzo, abril y mayo de 2016. Las hojas se depositaron en sobres de papel y se conservaron en heladera hasta su procesamiento (máximo por 2 meses) en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía.

3.2. OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS DE *V. inaequalis*

Los aislados monospóricos de *V. inaequalis* se obtuvieron directamente a partir de conidios presentes en los síntomas de las hojas colectadas. De cada hoja se eligió una mancha esporulada de la cual se obtuvo un único aislado monospórico.

Para la extracción de los conidios con una micropipeta se colocó una gota de 100µl de agua destilada estéril sobre las manchas. Para que las esporas se desprendieran y quedaran en suspensión, con la ayuda de la micropipeta la gota fue absorbida y vuelta a colocar sobre la mancha varias veces. Finalmente con la ayuda de un anza de Drigalsky la gota con las esporas en suspensión se retiró de la hoja y se sembró en una placa de Petri con medio de cultivo Agar Agua

(Bacto™ Agar, Le Pont de Claix, Francia) con antibiótico sulfato de estreptomina (Sigma-ALdrich, China) a una concentración de 0,4g/L. Las placas se incubaron en estufa termostatzada a 20°C en oscuridad durante 24 horas.

Luego de 24 horas de incubación se observaron las placas bajo microscopio y se buscaron conidios germinados y relativamente aislados de otros (figura No. 3). Con la ayuda de agujas hipodérmicas descartables, bajo lupa y microscopio (100X), se repicaron conidios individuales germinados a placas con medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). Para incrementar las chances de obtener un aislado monospóric de cada placa original se transfirieron entre cinco y diez esporas germinadas. Las placas se incubaron en las mismas condiciones indicadas anteriormente durante cinco a diez días hasta observar crecimiento micelial.

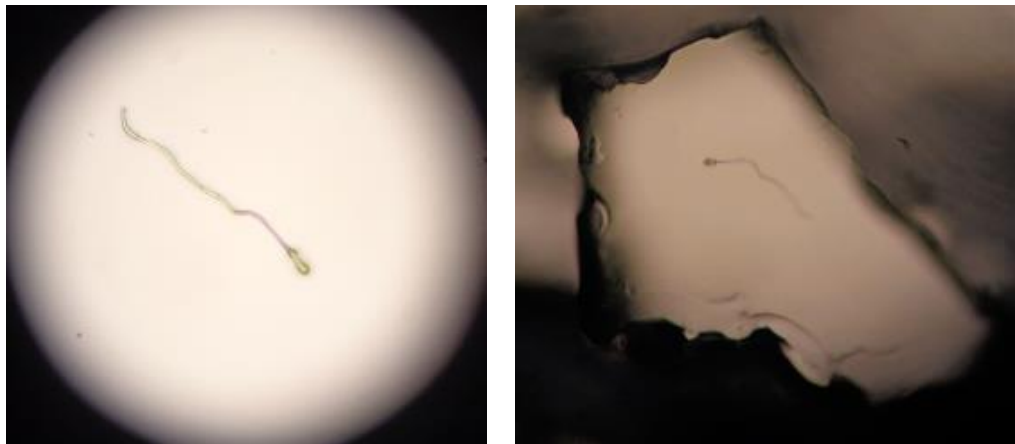


Figura No. 3. Esporas de *V. inaequalis* aisladas germinadas

Como la mayoría de las colonias que crecieron en PDA a partir de las esporas individuales transferidas presentaron alguna contaminación con levaduras, fue necesario recurrir a la técnica de aislamiento a partir de puntas de hifas para de ese modo obtener las colonias aisladas y libres de contaminaciones. Con aguja histológica y bajo la lupa se tomó una punta de hifa de la colonia menos contaminada de cada placa, y se repicó a una nueva placa con PDA, incubándose en estufa en las mismas condiciones hasta observar crecimiento micelial. Se hicieron repiques sucesivos hasta obtener los cultivos monospóricos libres de contaminaciones. Una vez obtenido un aislado monospóric proveniente de cada una de las manchas se procedió a descartar el resto de las esporas repicadas.

De esta manera se obtuvieron 228 aislados monospóricos, los cuales se mantuvieron en medio PDA, en estufa a 20°C y en oscuridad hasta la realización de los ensayos.

3.3. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS AISLADOS DE *V. inaequalis* AL FUNGICIDA DODINE

La sensibilidad de *V. inaequalis* a dodine se evaluó por el método de inhibición del crecimiento micelial. Para evaluar la sensibilidad de los aislados provenientes de los diferentes montes se determinó el crecimiento relativo micelial de cada aislado a una concentración única de evaluación (CUE) del fungicida con respecto al crecimiento sin fungicida (Mondino et al., 2015).

3.3.1. Determinación de la concentración única de evaluación (CUE)

La concentración única del fungicida utilizada para evaluar la inhibición del crecimiento fue aquella en la cual el crecimiento relativo a dicha concentración respecto al crecimiento sin fungicida correlacionara mejor con la concentración efectiva 50 (CE₅₀) del fungicida evaluado. Para ello se realizó un ensayo previo con una submuestra de 12 aislados provenientes de un monte con historia de no más de dos aplicaciones por temporada de dodine (monte No. 3) y se determinó la CE₅₀ del fungicida para cada uno de esos aislados. La determinación de la CE₅₀ se realizó midiendo el porcentaje de crecimiento relativo micelial en un set de concentraciones.

De la zona de avance de las colonias se cortaron discos de 4mm de diámetro y se sembraron en el centro de placas con medio de cultivo PDA enmendadas con dodine a distintas concentraciones. El fungicida comercial utilizado fue Syllit, de LANAFIL S.A. (suspensión concentrada, 400g/L de ingrediente activo). El medio de cultivo se autoclavó el día previo, y se mantuvo en estufa termostatzada a 55°C. Antes de dispensarlo en las placas de Petri se le incorporó la cantidad necesaria de una dilución 1/1000 del fungicida para obtener la concentración final deseada. Las concentraciones de dodine evaluadas fueron 0 (control); 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; y 5,0 ppm.

Se sembraron tres diferentes aislados por placa, y se completaron cuatro repeticiones. Las placas se incubaron en estufa termostatzada a 20°C en oscuridad, durante cuatro semanas. Transcurrido ese tiempo, se determinó el crecimiento micelial de cada aislado a cada concentración. Se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro de las colonias con calibre digital (Kamasa KM-447, USA). El crecimiento micelial de cada aislado a cada concentración se determinó como el promedio entre las cuatro repeticiones del diámetro menos cuatro milímetros (correspondientes al diámetro del disco de micelio sembrado) dividido entre dos.

El crecimiento relativo de cada aislado se calculó como la relación entre el crecimiento micelial en el medio con fungicida y el crecimiento micelial en el medio sin fungicida (control 0ppm), expresado en porcentaje.

Para determinar la CE_{50} del fungicida para cada uno de los aislados, los datos de porcentaje de crecimiento relativo a cada concentración evaluada fueron transformados mediante Probit, mientras que a los valores de concentración se le aplicó la transformación logaritmo decimal. Se ajustaron rectas de regresión lineal entre estas variables para cada aislado, y se definió la CE_{50} como aquella concentración de fungicida que causa el 50% de la inhibición del crecimiento micelial.

La CUE se definió como aquella concentración a la cual el coeficiente de determinación lineal (R^2) entre el $\log_{10} CE_{50}$ y el porcentaje de crecimiento relativo de los aislados a dicha concentración fuera la más cercana a 1.

3.3.2. Ensayo de evaluación de la sensibilidad

La evaluación de la sensibilidad de los aislados provenientes de los distintos montes a dodine se realizó midiendo la inhibición del crecimiento micelial a la CUE definida, que fue de 0,05ppm. Del mismo modo que en el ensayo de determinación de la CUE, el medio de cultivo PDA se autoclavó y dispensó en las placas el día previo. El fungicida se incorporó en las mismas condiciones. Se utilizaron dos concentraciones de dodine, 0 ppm (control) y 0,05 ppm (CUE).

De cada aislado se cortaron discos de la zona de avance del micelio de 4 mm de diámetro. Se sembraron cuatro aislados diferentes por placa, y se completaron cuatro repeticiones. Las placas se incubaron en estufa termostatzada a 20°C en oscuridad durante cuatro semanas. Las mediciones de crecimiento micelial se realizaron como fue descrito anteriormente.

3.3.3. Análisis estadístico

Para estudiar el efecto de la historia de uso del dodine sobre la sensibilidad actual de las poblaciones de *V. inaequalis* se propuso el siguiente modelo: $Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$, donde Y_{ij} es el porcentaje de crecimiento en el medio con fungicida respecto al crecimiento sin fungicida, μ es la media general, T_i el efecto monte (historia de uso) y ε_{ij} el error experimental.

Se realizó un análisis de varianza, donde la variable dependiente fue Crecimiento Relativo y la variable de clasificación Monte. Las medias se compararon mediante el Test de Tukey ($\alpha=0,05$). El paquete estadístico utilizado fue InfoStat/Estudiantil (versión 2016e).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÚNICA DE EVALUACIÓN (CUE)

El crecimiento relativo de los aislados de *V. inaequalis* creciendo en medio PDA con una concentración de 0,05 ppm de dodine respecto al testigo sin fungicida fue el que mejor correlacionó con la CE_{50} del fungida dodine de dichos aislados. A esa concentración se obtuvo el coeficiente de determinación lineal (R^2) más alto que fue 0,914 (figura No. 4). Por lo tanto, la concentración 0,05 ppm de dodine fue seleccionada como la concentración más apropiada para evaluar la sensibilidad de todas las poblaciones de *V. inaequalis* al fungicida dodine de acuerdo a lo propuesto por Mondino et al. (2015).

La determinación de la sensibilidad de una población de aislados a un fungicida en base al crecimiento relativo de dichos aislados en un medio enmendado con una concentración única del fungicida, parte de la base de que un aislado más sensible al fungicida tendrá un crecimiento menor que otro más resistente a la misma concentración. Sin embargo, no puede utilizarse cualquier concentración ya que cuanto mayor sea esta menos útil resulta como herramienta para diferenciar a los aislados por su sensibilidad.

Coincidiendo con lo expuesto por Mondino et al. (2015) los resultados muestran que a medida que se incrementa la concentración del fungicida, la correlación entre el porcentaje de crecimiento relativo de los aislados a esa concentración respecto al crecimiento en el medio sin fungicida va disminuyendo. De modo que a 5,0 ppm el R^2 es de apenas 0,58.

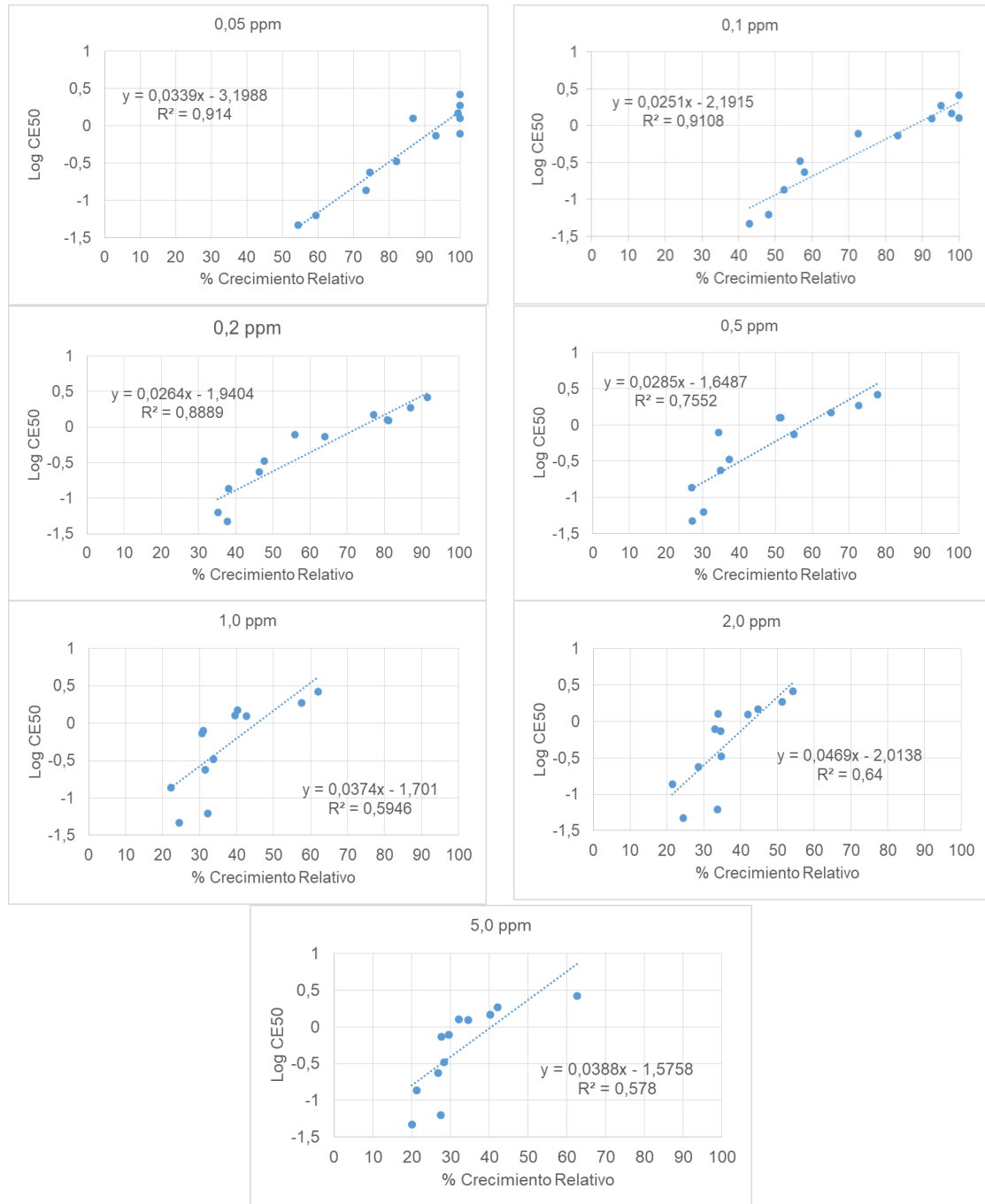


Figura No. 4. Regresión lineal entre el $\text{Log}_{10}\text{CE}_{50}$ del fungicida dodine y el crecimiento relativo en porcentaje de los aislados seleccionados para cada concentración evaluada

4.2. SENSIBILIDAD DE POBLACIONES DE *V. inaequalis* A DODINE

Las medias del porcentaje de crecimiento relativo de las poblaciones a la CUE (0,05 ppm) variaron de 75,16% a 92,7%, mientras que el rango se ubicó entre 16,53% y 100% (cuadro No. 3). Asimismo se constató que en todas las poblaciones de *V. inaequalis* evaluadas sobre las cuales se han hecho aplicaciones de dodine predominan los aislados que presentan valores de porcentaje de crecimiento relativo de la parte superior del rango, es decir aislados que presentan baja sensibilidad relativa a dodine (figura No. 5).

Cuadro No. 3. Sensibilidad de poblaciones de *V. inaequalis* provenientes de siete montes con diferente historia de uso de dodine

Monte	Historia de uso del dodine	% crecimiento relativo a la CUE ^a		
		Mínimo	Media ^d	Máximo
5	Bajo uso ^b	65,49	92,7 a	100
7	Sin uso desde 2011	52,17	92,12 a	100
6	Alto uso ^c	69,62	90,13 a	100
2	Bajo uso	55,11	87,4 ab	100
3	Bajo uso	55,14	85,53 ab	100
4	Bajo uso	46,49	83,35 ab	100
1	Sin uso	16,53	75,16 b	100

^a Concentración única evaluatoria de dodine (0,05 ppm)

^b Realiza una o dos aplicaciones por temporada de dodine

^c Realiza tres o más aplicaciones por temporada de dodine

^d Medias seguidas con la misma letra no presenta diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $P \leq 0,05$)

Como se observa en el cuadro No. 3, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de crecimiento relativo a la CUE de las poblaciones sobre las cuales se han hecho aplicaciones de dodine. A su vez, la población sobre la cual directamente nunca se aplicó el fungicida (población proveniente del monte No. 1) tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas con algunas poblaciones sobre las cuales se han realizado hasta dos aplicaciones de dodine por temporada en los últimos años (poblaciones provenientes de los montes No. 2, 3 y 4).

Si bien no fue posible diferenciar estadísticamente el porcentaje de crecimiento de la población procedente del monte sin antecedentes de uso de dodine de tres poblaciones de montes con bajo uso del fungicida, se observó que esta población presentó el menor valor de media de crecimiento relativo (mayor sensibilidad).

Al no disponer de datos acerca de cuál fue la resistencia o sensibilidad de base a dodine de las poblaciones de *V. inaequalis* antes de que comenzara a

utilizarse dicho fungicida en Uruguay, fue necesario utilizar como testigo a la población de un monte sin historia de uso conocida del fungicida, como es el caso del monte No. 1. De todos modos, al encontrarse este monte ubicado en medio de una zona de producción de manzanos y rodeado de otros montes frutales en los cuales se utiliza el fungicida dodine, los niveles de sensibilidad encontrados en la población proveniente de dicho monte podrían no ser un fiel reflejo de la sensibilidad de base.

Esto es debido a que las ascosporas pueden ser arrastradas por las corrientes de aire distancias de hasta 300 metros (García y Moscardi, 1975). La presencia de aislados con baja sensibilidad relativa a dodine encontrados en el monte No. 1 puede explicarse tanto por la existencia de una variabilidad intrínseca de la población como por la migración de individuos provenientes de poblaciones linderas, expuestas al fungicida. Por esta razón, no es posible asegurar que el nivel de sensibilidad encontrado en esta población corresponda al de una población efectivamente nunca expuesta al fungicida.

Como se observa en la figura No. 5, en todas las poblaciones evaluadas los aislados con crecimiento relativo mayor a 90% se presentan en alta frecuencia. Köller et al. (1999) clasifican a los aislados de *V. inaequalis* entre sensibles y resistentes a dodine en función del porcentaje de crecimiento relativo que presentan a una CUE de 0,2 ppm. Dichos autores clasifican a los aislados que presentan crecimiento relativo inferior a 70% como sensibles, y definen a las poblaciones sensibles como aquellas poblaciones en las cuales predominan dichos aislados. Por el contrario, los aislados con crecimiento relativo superior a 90% son clasificados como resistentes, por lo que las poblaciones en las cuales éstos se encuentran en mayor proporción se definen resistentes.

Por otra parte, Köller et al. (1999) definieron como poblaciones con niveles de sensibilidad límite a dodine a aquellas poblaciones en las cuales la proporción de aislados con crecimientos relativos superiores a 70% se incrementa respecto a las poblaciones sensibles, pero en las cuales la proporción de aislados con crecimientos relativos mayores a 90% no es tan elevada como en las poblaciones definidas como resistentes.

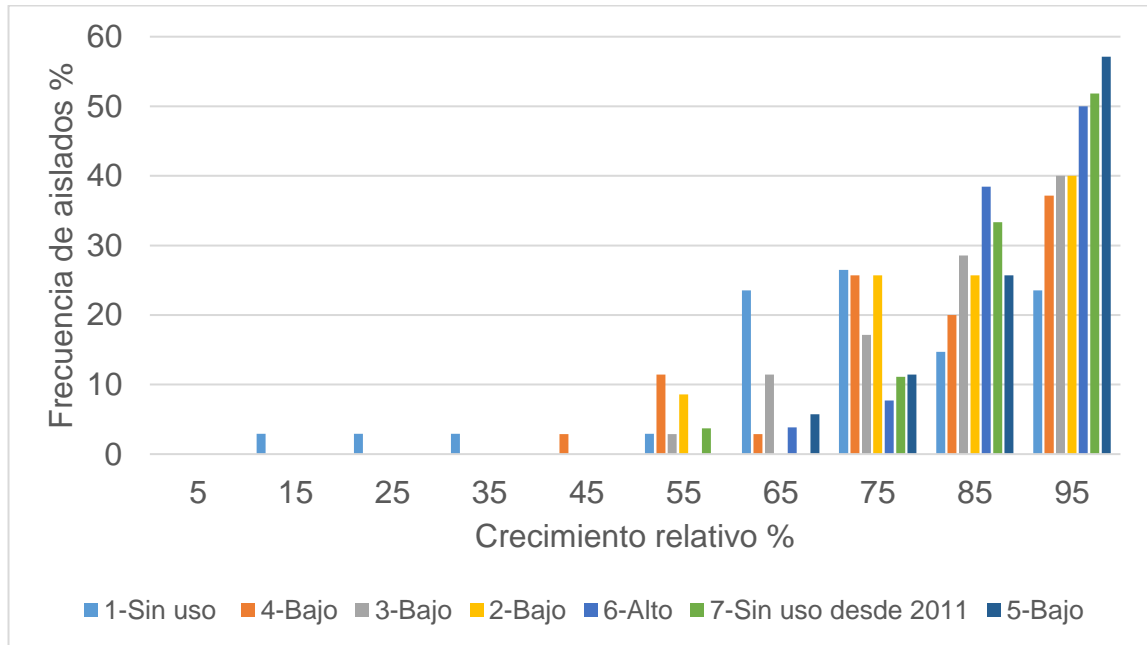


Figura No. 5. Distribución de la sensibilidad de poblaciones de *V. inaequalis* a dodine

Nuestros resultados muestran una predominancia de aislados con porcentaje de crecimiento relativo superior a 90% en todas las poblaciones sobre las cuales se han realizado aplicaciones de dodine. Usando el mismo criterio utilizado por Köller et al. (1999) dichas poblaciones podrían ser clasificadas como resistentes a dodine. Sin embargo el hecho de haber utilizado una CUE menor a la utilizada por Köller et al. (1999) estaría sobreestimando la proporción de aislados resistentes.

Analizando con mayor detalle se observa que la población proveniente del monte No. 1 (sin antecedentes de aplicación de dodine) presenta un 23,5% de los aislados con crecimiento relativo mayor a 90% (cuadro No. 4). Si bien en esta población, a diferencia de en las otras, estos aislados no son los que predominan, los mismos también se encuentran en alta frecuencia.

Cuadro No. 4. Proporción de aislados de *V. inaequalis* con crecimientos relativos a la concentración única de evaluación mayores a 90% y 95%

Monte	Historia de uso del dodine	% de aislados con crecimiento relativo a la CUE ^a	
		>90 %	>95 %
5	Bajo uso ^b	57,14	42,86
7	Sin uso desde 2011	51,85	44,44
6	Alto uso ^c	50	34,62
2	Bajo uso	40	34,29
3	Bajo uso	40	25,71
4	Bajo uso	37,14	28,57
1	Sin uso	23,53	14,71

^a Concentración única evaluatoria de dodine (0,05 ppm)

^b Realiza una o dos aplicaciones por temporada de dodine

^c Realiza tres o más aplicaciones por temporada de dodine

No es posible utilizar el mismo criterio que Köller et al. (1999) para clasificar las poblaciones entre sensibles y resistentes debido a que utilizaron como CUE una concentración de 0,2 ppm de dodine, es decir una concentración cuatro veces mayor a la utilizada en este trabajo. En nuestro trabajo desestimamos utilizar la concentración de 0,2 ppm como concentración de evaluación debido a la menor correlación existente entre el porcentaje de crecimiento relativo y la CE₅₀ a dicha concentración ($R^2 = 0,89$). De todos modos es posible suponer que al evaluar el crecimiento relativo de todas las poblaciones a dicha concentración, la proporción de aislados con crecimiento relativo mayor a 90% disminuya en comparación a lo encontrado al trabajar con una CUE de 0,05 ppm.

En nuestro trabajo pudimos comprobar que realizar la elección de la CUE solamente teniendo en cuenta la correlación entre los crecimientos relativos de los aislados y la CE₅₀ podría llevar a sobrestimar la proporción de aislados resistentes. Una posible solución podría ser elegir una CUE mayor a pesar de que la correlación entre los valores obtenidos de crecimiento relativo con la CE₅₀ de los aislados no sea la más alta. Si se quiere optimizar la correlación entonces se deberá elegir un valor discriminatorio superior. Por ejemplo en nuestro caso podría ser necesario considerar resistentes a aquellos aislados que presenten valores de crecimiento relativo superior a 95%.

Aplicando este criterio más exigente para diferenciar los aislados (considerar resistentes a aquellos que presenta crecimiento relativo mayor a 95%), se puede apreciar que la proporción de individuos de *V. inaequalis* resistentes a dodine en las poblaciones evaluadas sigue siendo alta en todos los montes (cuadro No. 4).

De todos modos la única manera certera de confirmar si la presencia de aislados con más de 95% de crecimiento relativo a la CUE utilizada significa que estamos frente a la presencia de resistencia práctica sería realizando ensayos de campo en los que se evalúe la eficiencia del control de la sarna, aplicando el fungicida dodine a las dosis recomendadas.

En la figura No. 6 se observa como al aumentar la concentración las diferencias entre el porcentaje de crecimiento relativo de los aislados se hacen menores dificultando la discriminación entre ellos por su sensibilidad. La capacidad discriminatoria aumenta en la medida en que se usan concentraciones menores del fungicida. Sin embargo en las concentraciones más bajas los aislados menos sensibles se juntan en valores cercanos a 100% de crecimiento relativo, perdiéndose la capacidad de discriminar entre ellos.

Utilizar una CUE muy baja puede dificultar la discriminación de los niveles de resistencia entre los aislados menos sensibles al fungicida. Si bien a la concentración de 0,05 ppm de dodine se encontró la mayor correlación con la CE₅₀ de los aislados, en la figura No. 6 se puede apreciar como los aislados menos sensibles alcanzan valores de crecimiento relativos del 100%.

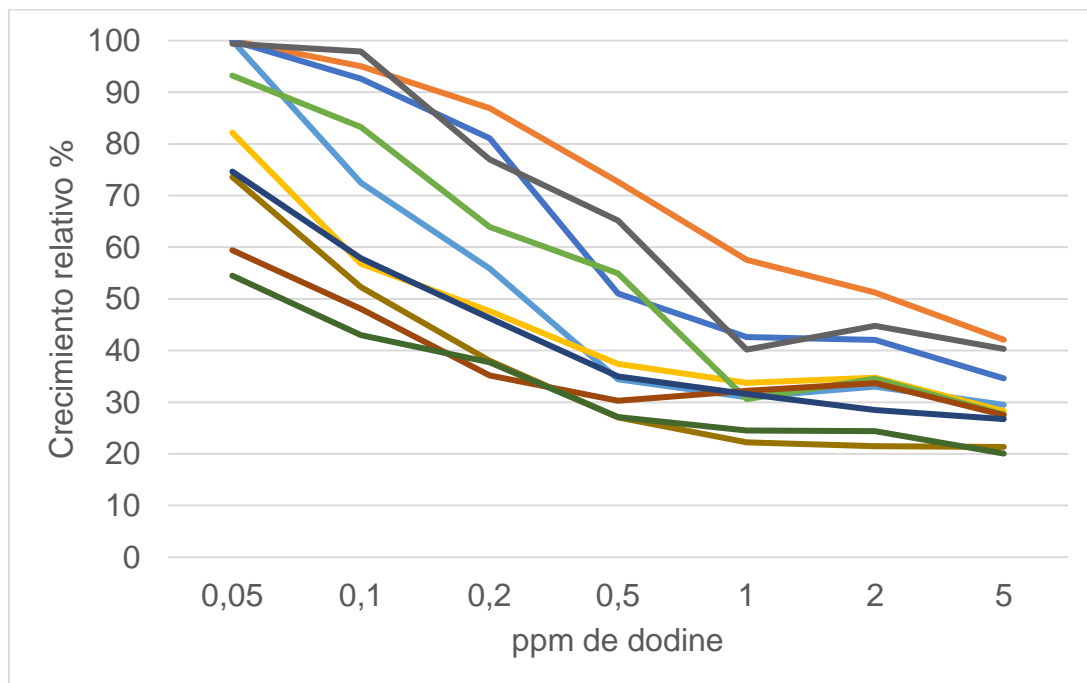


Figura No. 6. Crecimiento relativo de aislados de *V. inaequalis* a concentraciones crecientes de dodine

A las concentraciones de 0,1 y 0,2 ppm de dodine las correlaciones encontradas en el ensayo de determinación de la CUE (0,9108 y 0,8889 respectivamente) fueron apenas menores a la encontrada con 0,05 ppm, que fue de 0,914. Ambas concentraciones presentan altas correlaciones y a diferencia de los que sucede a 0,05 ppm, los crecimientos relativos de los aislados presentan mayor dispersión principalmente en los niveles de mayor crecimiento relativo, permitiendo discriminarlos mejor.

Realizar una nueva evaluación de la sensibilidad de estas poblaciones utilizando como CUE 0,2 ppm de dodine permitiría comparar nuestros resultados con los obtenidos por Köller et al. (1999).

Otra diferencia entre el trabajo de Köller et al. (1999) y el nuestros es que entre las poblaciones de *V. inaequalis* evaluadas por dichos autores había poblaciones en las cuales ya había sido constatada resistencia práctica a dodine. En los montes evaluados en nuestro trabajo aún no han sido denunciadas fallas en el control de *V. inaequalis* con este fungicida.

No fue posible determinar si la predominancia de aislados con menores niveles de sensibilidad relativa encontrados en forma generalizada en los montes con antecedentes de uso de dodine se deben a la historia de uso reciente del fungicida o si por el contrario esta pérdida de sensibilidad se debe al uso histórico de este fungicida antes de que aparecieran los IBE en el mercado.

Antes de que aparecieran los fungicidas IBE en el mercado (década de los 80), el dodine era uno de los fungicidas más utilizado para el control de *V. inaequalis* debido a su actividad postinfección (García y Moscardi, 1981).

Estudios realizados por Broniarek-Niemiec y Bielenin (2008), Meszka et al. (2008), Carisse y Jobin (2010) indican que la resistencia a dodine en los individuos de *V. inaequalis* es estable en el tiempo. Al no ser posible asociar la historia de uso reciente del fungicida con los niveles de sensibilidad encontrados, es posible suponer que la baja sensibilidad relativa encontrada en las poblaciones se hubiese generado en épocas en que se hizo el mayor uso del dodine y que entonces esta situación permaneció en el tiempo a pesar de que el uso de dicho fungicida haya disminuido en los últimos años.

5. CONCLUSIONES

Es necesario corroborar con ensayos de campo que evalúen la eficiencia del dodine en el control de *V. inaequalis* los resultados de baja sensibilidad obtenidos in vitro.

Es recomendable minimizar el uso de dodine para el control de la sarna del manzano en Uruguay.

Es necesario revisar la metodología de selección de la CUE propuesta por Mondino et al. (2015) incorporando el análisis de la capacidad para discriminar niveles de sensibilidad al fungicida entre los aislados de mayor resistencia al fungicida.

6. RESUMEN

El cultivo del manzano es el principal cultivo de frutales de hoja caduca en Uruguay. Este cultivo es afectado por distintas enfermedades pero la más significativa, tanto por los daños que ocasiona como por los altos costos que insume su control, es la sarna del manzano ocasionada por *Venturia inaequalis*. Su control se realiza mediante la aplicación de fungicidas. Actualmente se utiliza una estrategia de control químico preventiva y se recurre a aplicaciones de fungicidas con actividad postinfección cuando por distintas razones no es posible evitar las infecciones. Dentro de los primeros fungicidas que se utilizaron con actividad postinfección se encuentra el dodine. Posteriormente, con la aparición de los fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE) en el mercado, el dodine fue dejado de lado. Actualmente, debido a la constatación de resistencia en las poblaciones de *V. inaequalis* a los IBE, el uso de dodine ha sido retomado. En el mundo existen antecedentes sobre la existencia de poblaciones de *V. inaequalis* resistentes a dodine, indicando incluso que se trata de una resistencia estable en el tiempo. Con el objetivo de conocer cuál es el estado de situación actual en cuanto al nivel de sensibilidad a dodine en nuestro país y asociar esto a la historia reciente de uso del fungicida se obtuvieron aislados monospóricos de *V. inaequalis* provenientes de montes de manzano de la principal zona de producción de Uruguay con diferente historia de uso del dodine. La sensibilidad a dodine se determinó mediante la evaluación del crecimiento relativo a una concentración única de evaluación (CUE) respecto al crecimiento sin fungicida. Como resultado del trabajo se constató la predominancia de aislados con baja sensibilidad relativa a dodine en forma generalizada en todas las poblaciones de *V. inaequalis* evaluadas. Los bajos niveles de sensibilidad no pudieron ser asociados a la historia reciente de uso del fungicida. Se concluye la necesidad de minimizar el uso del fungicida dodine para el control de la sarna del manzano. A futuro sería deseable realizar ensayos de campo que permitan evaluar la eficiencia de dodine en el control de *V. inaequalis* a las dosis recomendadas de uso para determinar si los niveles de resistencia encontrados in vitro implican la existencia de resistencia práctica.

Palabras clave: *Venturia inaequalis*; Sarna del manzano; Dodine; Resistencia a fungicidas.

7. SUMMARY

The apple crop is the main one among the deciduous fruit crops grown in Uruguay. It is affected by different diseases, the most significant of them being apples scab, both due to the damage it causes and to the high costs of its control. Caused by the *Venturia inaequalis* fungus, its control is carried out by the application of fungicides. Currently, the chosen strategy requires preventive chemical control with the addition of fungicide applications with postinfection activity whenever infections can not be avoided. Among the first fungicides used for postinfection activity is dodine. Eventually, as ergosterol biosynthesis inhibitory fungicides were launched into market, dodine was somewhat left aside. Nevertheless, through the finding of resistance of *V. inaequalis* populations to the new fungicides, the use of dodine has been currently resumed. Reports arose worldwide concerning the existence of populations of *V. inaequalis* resistant to dodine, and even suggesting a stable resistance over time. In order to establish the current state of the dodine sensitivity and its association with the recent history of fungicide use, monoconidial isolates samples of *V. inaequalis* were collected for purpose studies from apple orchards with different history of dodine use from the main production area in Uruguay. The sensitivity of isolates to dodine was assessed by calculating the relative growth to a single-assessment concentration (SAC). As a result of the work, the predominance of isolates with lower relative sensitivity to dodine was found in all populations of *V. inaequalis* evaluated. Low levels of sensitivity could not be associated with the recent history of fungicide use. It is concluded that is necessary to minimize the application of dodine for the control of apple scab. In the future it would be desirable to carry out field trials to evaluate the efficiency of dodine in the control of *V. inaequalis* at the recommended doses of use to determine if resistance levels found in vitro means the existence of practical resistance.

Keywords: *Venturia inaequalis*; Apple scab; Dodine; Fungicides resistance.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. 1995. Fitopatología. 2a. ed. México, Limusa. 838 p.
2. Alaniz, S.; Leoni, C.; Mondino, P. 2003. Manejo de la sarna del manzano sin aplicaciones de fungicidas durante el verano. In: Telis, V.; Carrega, E. eds. Programa de Reconversión de la Granja (PREDEG). Producción Integrada en Uruguay. La clave de un sistema amigable con el medio ambiente, que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad. Montevideo, Artes Gráficas. pp. 127-130.
3. _____.; _____.; Bentancur, O.; Mondino, P. 2014. Elimination of summer fungicide sprays for apple scab (*Venturia inaequalis*) management in Uruguay. *Scientia Horticulturae*. 165: 331-335.
4. _____.; Gepp, V.; Mondino, P.; Leoni, C.; Núñez, S.; Mujica, V.; Scatoni, I. 2016. Guía de identificación y monitoreo de enfermedades y plagas en frutales de hoja caduca y vid. s.n.t. 135 p.
5. Bakker, G. R. 1999. Sensitivity of *Venturia inaequalis* and *V. pirina* to dodine in New Zealand. In: New Zealand Plant Protection Conference (52nd., 1999, Nueva Zelanda). Proceedings. s.n.t. pp. 167-170.
6. Beresford, R. M.; Wright, P. J.; Wood, P. N.; Park, N. M. 2012. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to myclobutanil, penconazole and dodine in relation to fungicide use in Hawke's Bay apple orchards. *New Zealand Plant Protection*. 65: 106-113.
7. _____.; _____.; _____.; _____.; Larsen, N. J.; Fisher, B. M. 2013. Resistance of *Venturia inaequalis* to demethylation inhibitor and dodine fungicides in four New Zealand apple-growing regions. *New Zealand Plant Protection*. 66: 274-283.
8. Brent, K.; Hollomon, D. 2007a. Fungicide resistance; the assessment of risk. (en línea). 2nd. ed. rev. Briston, UK, FRAC. 52 p. (FRAC Monograph no. 2). Consultado abr. 2017. Disponible en <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-2.pdf?sfvrsn=8>
9. _____.; _____. 2007b. Fungicide resistance in crop pathogens; how can it be managed?. (en línea). 2nd. ed. rev. Briston, UK, FRAC. 56 p. (FRAC Monograph no. 1). Consultado abr. 2017. Disponible en <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf?sfvrsn=8>

10. Broniarek-Niemiec, A.; Bielenin, A. 2008. Resistance of *Venturia inaequalis* to strobilurin and dodine fungicides in polish apple orchards. *Zemdirbyste Agriculture*. 95 (3): 366-372.
11. Carbonell, J.; Briozzo, J.; Moscardi, C.; García, S. 1975. Calendario de pulverizaciones para manzano. Ministerio de Agricultura y Pesca/CIAAB. Hoja de divulgación no. 9. 4 p.
12. Carisse, O.; Jobin, T. 2010. Resistance to dodine in populations of *Venturia inaequalis* in Quebec, Canadá. (en línea). *Plant Health Progress*. s.p. Consultado 15 abr. 2017. Disponible en <https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2010/dodine/>
13. Chapman, K. S.; Sundin, G. W.; Beckerman, J. L. 2011. Identification of resistance to multiple fungicides in field populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease*. 95: 921-926.
14. Cox, K. D. 2015. Fungicide resistance in *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab, in the United States. In: Ishii, H.; Hollomon, D. eds. *Fungicide resistance in plant pathogens*. Tokyo, Springer. pp. 433-447.
15. Crute, I. R. 1992. The contribution of genetic studies to understanding fungicide resistance. In: Denholm, I.; Devonshire, A. L.; Hollomon, D. eds. *Achievements and developments in combating pesticide resistance*. London, Springer. pp. 190-202.
16. Díaz, L. 1997. Evaluación de resistencia de *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., (organismo causal de la sarna del manzano), a benomil y dodine. In: Congreso Latinoamericano de Fitopatología (9º., 1997, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, Zeneca. p. 156.
17. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, IT). 2013. FAOSTAT. (en línea). Roma. s.p. Consultado nov. 2016. Disponible en <http://faostat.fao.org/beta/es/#data/QC>
18. FRAC (Fungicide Resistance Action Committee, CH). s.f. Resistance overview. Mechanisms of fungicide resistance. (en línea). Basel. s.p. Consultado mar. 2017. Disponible en <http://www.frac.info/resistance-overview/mechanisms-of-fungicide-resistance>
19. _____. 2017. Code list; fungicides sorted by mode of action. (en línea). Basel. 12 p. Consultado mar. 2017. Disponible en <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2017-final.pdf?sfvrsn=2>

20. García, S.; Moscardi, C. 1975. Sarna del manzano; sintomatología y ciclo biológico. CIAAB. Hoja de Divulgación no. 23. 5 p.
21. _____; _____. 1981. El sistema de alarma para el control de la sarna del manzano. Miscelánea CIAAB. no. 33. 9 p.
22. _____; Orrico, J.; Wallasek, V. 1997. Control de sarna primaria en un programa de aplicaciones reducidas usando kresoxim-metil. In: Jornada de Resultados sobre Protección Vegetal en Frutos (1997, Canelones). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 68-71 (Actividades de Difusión no. 150).
23. _____. 1998. Enfermedades a hongos que deben ser consideradas prioritariamente dentro de un programa de manejo integrado. In: Núñez, S.; García, S.; Paullier, J.; Pagani, C.; Maeso, D. eds. Guía para el manejo de plagas y enfermedades en frutales. Montevideo, INIA. pp. 49-90 (Boletín de Divulgación no. 66).
24. Holb, I. J.; Jong, P. F.; Heijne, B. 2003. Efficacy and phytotoxicity of lime sulphur in organic apple production. *Annals of Applied Biology*. 142(2): 225-233.
25. Jobin, J.; Carisse, O. 2007. Incidence of myclobutanil and kroxim methyl insensitive isolates of *Venturia inaequalis* in Quebec orchards. *Plant Disease*. 91: 1351-158.
26. Jones, A.; Aldwinckle, H. 2002. Plagas y enfermedades del manzano y del peral. Madrid, Mundi-Prensa. 99 p.
27. Katan, T.; Shabi, E.; Gilpatrick, J. D. 1983. Genetics of resistance to benomyl in *Venturia inaequalis* isolates from Israel and New York. *Phytopathology*. 73: 600-603.
28. Koeller, W. 2007. Apple scab and post-infection fungicides (Part III). *Scaffolds Fruit Journal*. 16 (9): 5-9.
29. 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 (2): 184-190.
30. _____; _____; Jones, A. L. 1999. Quantification, persistence, and status of dodine Resistance in New York and Michigan orchard populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease*. 83 (1): 66-70.
31. _____; Parker, D. M.; Trechek, W. W.; Rosenberger, D.; Wilcox, W.; Carroll, J.; Agnello, A.; Reissig, H. 2005. Fungicide resistance of apple

- scab; status Quo and management options. New York Fruit Quarterly. 13(1): 9-17.
32. Ma, Z.; Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*. 24: 853-863.
 33. MacHardy, W. E.; Gadoury, D. M. 1989. A revisión of Mills's criteria for predicting apple scab infection periods. *Phytopathology*. 79: 304-310.
 34. _____. 1996. *Apple scab; biology, epidemiology, and management*. St. Paul, Minnesota, APS. 545 p.
 35. Martínez, E.; Alaniz, S.; Mondino, P. 2014. Estudio de la descarga de ascosporas de *Venturia inaequalis*, agente causal de la sarna del manzano, mediante ensayos de liberación forzada. *In*: Congreso Nacional de Hortifruticultura (13°. 2014, Montevideo). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. p. 86.
 36. Meszka, B.; Broniarek-Niemiec, A.; Bielenin, A. 2008. The status of dodine resistance of *Venturia inaequalis* populations in Poland. *Phytopathologia Polonica*. 47: 57-61.
 37. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones y Estadísticas Agropecuarias, UY). 2016. Encuesta frutícola zafra 2016. (en línea). Montevideo. 19 p. Consultado feb. 2017. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/busqueda/mgap/encuesta%20frut%C3%ADcula>
 38. Mondino, P. 2003a. Manejo de la sarna del manzano bajo producción orgánica en Uruguay. *In*: Luna, H. ed. *Producción orgánica; aportes para el manejo de sistemas ecológicos en Uruguay*. Montevideo, Tradinco. pp. 186-198.
 39. _____.; Alaniz, S. 2003b. Programa de aplicaciones reducidas basadas en la descarga potencial de ascosporas (DPA). *In*: Telis, V.; Carrega, E. eds. *Programa de Reconversión de la Granja (PREDEG). Producción Integrada en Uruguay. La clave de un sistema amigable con el medio ambiente, que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad*. Montevideo, Artes Gráficas. pp. 123-126.
 40. _____.; _____.; Leoni, C. 2003c. Racionalización y reducción del uso de fungicidas en el control de la sarna del manzano ocasionada por *Venturia inaequalis*. *In*: Telis, V.; Carrega, E. eds. *Programa de*

Reconversión de la Granja (PREDEG). Producción Integrada en Uruguay. La clave de un sistema amigable con el medio ambiente, que permite obtener frutas y hortalizas de alta calidad. Montevideo, Artes Gráficas. pp. 119-121.

41. _____; _____. 2009. Manejo integrado de la sarna del manzano. In: Stadnik, M. ed. Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis, Alternativa Gráfica. pp. 35-43.
42. _____; Casanova, L.; Celio, A.; Bentancur, O.; Leoni, C. Alaniz, S. 2015. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin and difenoconazole in Uruguay. *Journal of Phytopathology*. 163 (1): 1-10.
43. _____; Alaniz, S. 2016. Manejo integrado de la sarna del manzano. *Agropecuária Catarinense*. 29 (2): 91-93.
44. Morgan, L. C.; Lorraine, P. B.; Heather, M. D. 2011. Alternative organic fungicides for apple scab management and their non-target effects. *HortScience*. 46(9): 1254-1259.
45. Olaya, G.; Köller, W. 1999. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobirulin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Disease*. 83(3): 274-278.
46. Pfeufer E. E.; Ngugi, H. K. 2012. Orchard factors associated with resistance and cross resistance to sterol demethylation inhibitor fungicides in populations of *Venturia inaequalis* from Pennsylvania. *Phytopathology*. 102 (3): 272-282.
47. Rosenberger, D. A. 2011. Understanding the limitations of newer apple fungicides. In: New England Vegetables and Fruit Conference (2011, Manchester). Proceedings. Manchester, s.e. pp. 113-115.
48. Ross, R. G.; Newbery, R. J. 1977. Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine in Nova Scotia. *Canadian Plant Disease Survey*. 57: 57-60.
49. Schwabe, W.; Jones, A.; Jonker, J. 1984. Changes in the susceptibility of developing apple fruit to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*. 74 (1): 118-121.
50. Sholberg, P. L.; Yorston, J. M.; Warnock, D. 1989. Resistance of *Venturia inaequalis* to benomyl and dodine in British Columbia, Canada. *Plant Disease*. 73: 667-669.
51. Soria, J.; Pisano, J. 2009. Comportamiento de variedades de manzana. Montevideo, INIA. 13 p. (Actividades de Difusión no. 561).

52. Stevic, M.; Vuksa, P.; Elezovic, I. 2010. Resistance of *Venturia inaequalis* to demethyltion inhibiting (DMI) fungicides. *Zimberbiste*. 97 (4): 65-72.
53. Szkolnik, M.; Gilpatrick, J. D. 1969. Apparent resistance of *Venturia inaequalis* to dodine in New York apple orchards. *Plant Disease*. 53(11): 861-864.
54. _____.;_____. 1973. Tolerance of *Venturia inaequalis* in relation to the history of dodine usage in apple orchards. *Plant Disease*. 57(10): 817-821.
55. UdelaR. FA (Universidad de la República. Facultad de Agronomía, UY). s.f. Fungicidas autorizados en la producción integrada del manzano. (en línea). Montevideo, Facultad de Agronomía. Departamento de Protección Vegetal. s.p. Consultado mar. 2017. Disponible en http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/PI/Plaguicidas/Fungicidas_autorizados.htm
56. Vero, S.; Garmendia, G.; Alborés, S.; Di Masi, S.; 2009. Resistencia a fungicidas en la producción de manzana. In: Stadnik, M. ed. Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis, Alternativa Gráfica. pp. 79-104.