COMUNICACIÓN TÉCNICA

Evaluación de la sensibilidad a mancozeb y piraclostrobin de *Mycosphaerella nawae*, agente causal de la mancha foliar del caqui

Mónica Berbegal, Antonio Ramón-Albalat, y Josep Armengol (Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia).
José Giner (GMW bioscience SL).

Mycosphaerella nawae es el agente causal de la mancha foliar del caqui. El control de esta enfermedad se basa en tratamientos preventivos en primavera con diferentes materias activas, entre las que figuran mancozeb y piraclostrobin. A partir del mes de octubre de 2015 se recogieron hojas de caqui con síntomas de la enfermedad, procedentes de diferentes localizaciones geográficas en la Comunidad Valenciana y representativas de diferentes situaciones de tratamiento en campañas de cultivo anteriores. Mediante técnicas de aislamiento fúngico se obtuvo una colección de aislados del hongo. En este trabajo se evaluó la eficacia de las materias activas mancozeb y piraclostrobin sobre la inhibición del crecimiento miceliar de *M. nawae*, comparando la sensibilidad del conjunto de aislados actuales con aislados obtenidos en el primer año de la aparición de la enfermedad (2008). Para ello, se prepararon placas de medio de cultivo PDA toxificadas con cada uno de los fungicidas a concentraciones discriminantes (CE_{50}) de las materias activas: 27 ppm (mancozeb) y 1,5 ppm (piraclostrobin). Las placas se incubaron durante un mes a 25ºC, evaluándose al final de este período el porcentaje de crecimiento respecto al control no toxificado. En el caso de la materia activa piraclostrobin, se utilizaron cebadores específicos para buscar mutaciones puntuales del gen citocromo b (G143A), que se asocian a la resistencia al grupo de los fungicidas Quinone outside Inhibitors (QoI). Todos los aislados de *M. nawae* estudiados se mostraron sensibles a ambas materias activas y, además, no se detectaron mutaciones en el gen citocromo b. Se discute el papel del mancozeb como una herramienta necesaria para una protección sostenible del caqui frente a *M. nawae.*

Mycosphaerella nawae es el agente causal de la mancha foliar del caqui (Berbegal y col. 2010 y 2011). En 2008 se observaron por primera vez en la Comunidad Valenciana síntomas graves de esta enfermedad, que se caracteriza por la aparición de manchas necróticas, clorosis, defoliación, maduración anticipada y abscisión de los frutos (Figura 1). Una vez se observan los primeros síntomas, su evolución puede ser muy rápida, dando lugar a importantes pérdidas en el cultivo. *Mycosphaerella nawae* se reproduce mediante ascosporas que se forman en el interior de cuerpos fructíferos (pseudotecios) en la hojarasca infectada del suelo que se considera la principal fuente de inóculo del patógeno. Las ascosporas maduran durante el invierno y en primavera se liberan cuando las condiciones son adecuadas (Kwon y Park, 2004; Vicent y col. 2011). El control de esta enfermedad se basa en tratamientos preventivos en primavera con diferentes materias activas fungicidas, considerando las autorizaciones vigentes (Berbegal y col., 2011; GVA, 2017). Las recomendaciones de tratamiento se realizan teniendo en cuenta la fenología del cultivo, la presencia de inóculo y las condiciones favorables para la infección (Bassimba y col., 2017). De esta forma, los tratamientos se ajustan a los momentos de mayor riesgo, optimizando la estrategia de manejo de la enfermedad. Las aplicaciones se realizan siguiendo unas condiciones de uso muy restrictivas, considerando también los posibles problemas de residuos en la fruta y el riesgo de aparición de resistencias. En este sentido, se desconoce si, a pesar de las recomendaciones, se ha producido una pérdida de sensibilidad de los aislados del patógeno a las materias activas utilizadas en los tratamientos. El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad a mancozeb y piraclostrobin de una amplia colección de aislados del hongo *M. nawae* procedentes de campos de caqui con presencia de la enfermedad de la mancha foliar y con diferentes historiales de tratamientos fungicidas.

Material y métodos

Toma de muestras y aislamiento de *Mycosphaerella nawae*

A partir del mes de octubre de 2015, se estudiaron hojas de caqui con síntomas de la enfermedad de la mancha foliar causada por *M. nawae*, procedentes de parcelas localizadas en diferentes zonas geográficas en la Comunidad Valenciana, en las que se recogió toda la información disponible sobre el historial de tratamientos

Figura 1. A: detalle de las lesiones y clorosis en las hojas afectadas por *Mycosphaerella nawae*; B: defoliación, maduración anticipada y abscisión de frutos en árboles afectados.

fungicidas en el cultivo, tanto en el ciclo de cultivo del año en curso como en campañas de cultivo anteriores.

Las hojas afectadas se procesaron realizándose aislamientos en medio de cultivo para la obtención de cultivos puros de *M. nawae*. Para ello, se utilizaron los métodos habituales para al aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos. Además, cuando fue necesario, se confirmó molecularmente la identidad de los aislados de *M. nawae* mediante la metodología de PCR, con el uso de los cebadores específicos MNf y MNr, siguiendo el protocolo descrito por Berbegal y col. (2013).

Los aislados identificados como *M. nawae* se conservaron a -80ºC en crioviales con una solución de glicerol al 15%, estableciéndose una colección para ser utilizada posteriormente en el estudio de sensibilidad a fungicidas.

Evaluación de la sensibilidad a mancozeb y piraclostrobin

Se evaluó la sensibilidad del crecimiento miceliar de *M. nawae* a dos materias activas fungicidas, mancozeb y piraclostrobin, que fueron elegidas para el estudio, ya que eran los fungicidas más frecuentemente utilizados para el control del patógeno teniendo en cuenta el historial de tratamientos de las parcelas en las que se recogieron los aislados del hongo durante 2015.

Para, ello, se utilizaron 92 aislados de *M. nawae* obtenidos de hojas de caqui con síntomas de la enfermedad en la campaña de cultivo 2015. Además, en este estudio se incluyeron quince aislados adicionales de *M. nawae* obtenidos en 2008, al inicio de la epidemia de la enfermedad causada por este hongo, cuando las parcelas de caqui no se trataban todavía de forma sistemática con fungicidas, para su control. Estos aislados estaban conservados en la colección del Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universitat Politècnica de València (GIHF-IAM).

Para determinar la sensibilidad de los aislados a mancozeb y piraclostrobin se prepararon un total de ocho placas Petri por aislado (cuatro repeticiones del experimento por duplicado) con medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) con y sin toxificar, utilizando como concentraciones discriminantes las Concentraciones Efectivas 50 (CE_{50}) descritas para cada uno de estos fungicidas por Berbegal y col. (2011): 27 ppm para mancozeb y 1,5 ppm para piraclostrobin, respectivamente.

Aislado	Localización	Historial de tratamientos previos con mancozeb
1	No determinado	Sin tratamiento
13	Guadasuar	2013, 2014 y 2015
21	Guadasuar	2013, 2014 y 2015

Tabla 1. Aislados que en presencia de la CE_{50} de mancozeb presentaron un crecimiento superior al 70% con respecto al control (en al menos 12 de las 16 medidas registradas).

Aislado	Localización	Historial de tratamientos previos con piraclostrobin
6	Algemesí	2011, 2012, 2013, 2014 y 2015
10	Algemesí	2011
55	Anna	2014 y 2015
63	Alberic	Información no disponible
75	Villanueva de Castellón	2014 y 2015
76	Benimuslem	Información no disponible

Tabla 2. Aislados que en presencia de la CE_{50} de piraclostrobin presentaron un crecimiento superior al 70% con respecto al control (en al menos 12 de las 16 medidas registradas).

En el centro de cada una de las placas, con y sin los fungicidas, se sembró un disco de agar colonizado con cada uno de los diferentes aislados. Las placas así sembradas se incubaron durante un mes a 25ºC en oscuridad. Una vez terminado el periodo de incubación se midieron los diámetros perpendiculares de cada una de las placas (16 medidas por aislado, fungicida o control), para calcular el crecimiento miceliar medio diario de cada uno de los aislados en las placas toxificadas con los diferentes fungicidas y el porcentaje de crecimiento respecto al control sin toxificar.

Una vez obtenidos los resultados se seleccionaron aquellos aislados que presentaron un crecimiento miceliar superior al 70% respecto al control en al

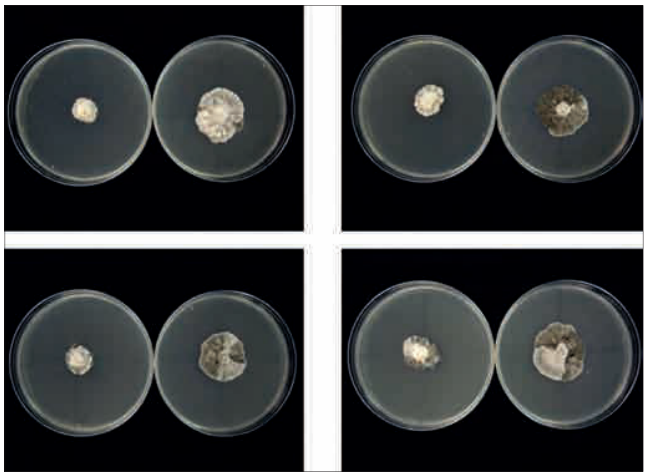

Figura 2. Ejemplo de los resultados de inhibición del crecimiento miceliar de aislados de *Mycosphaerella nawae* crecidos en medio de cultivo PDA toxificado con mancozeb (placas situadas a la izquierda), comparados con los controles sin toxificar (placas situadas a la derecha).

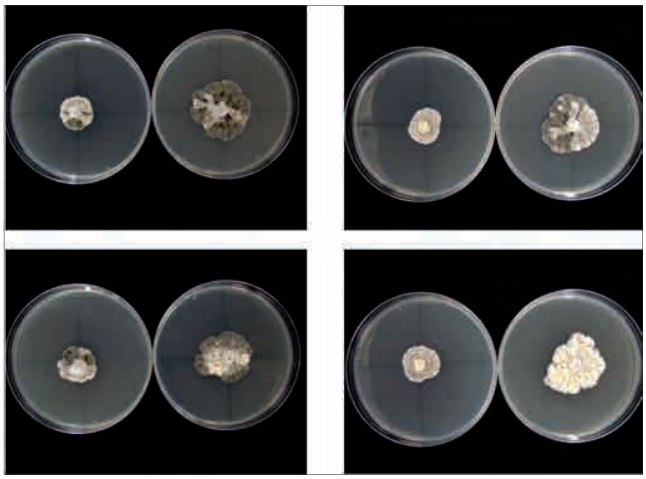

Figura 3. Ejemplo de los resultados de inhibición del crecimiento miceliar de aislados de *Mycosphaerella nawae* crecidos en medio de cultivo PDA toxificado con piraclostrobin (placas situadas a la izquierda), comparados con los controles sin toxificar (placas situadas a la derecha).

menos doce de las dieciséis medidas obtenidas a partir de las placas con los aislados en crecimiento. Siguiendo este criterio de selección, los aislados que en presencia de una concentración de fungicida equivalente a la CE_{50} de mancozeb o de piraclostrobin presentaron crecimientos elevados respecto al control se indican en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Con los aislados seleccionados como menos sensibles a piraclostrobin se decidió realizar un estudio adicional para su caracterización, aplicando un protocolo de identificación molecular de resistencia a fungicidas. Según la información disponible en el *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC) (www.frac.info), hay mutaciones descritas en el gen del citocromo b en diferentes patógenos fúngicos asociadas con resistencias al grupo de los QoI. En concreto, en diferentes especies de *Mycosphaerella* se han descrito mutaciones en la posición nucleotídica 143 relacionadas con un cambio del aminoácido Glicina a Alanina (G143A).

De este modo, para la caracterización molecular de los aislados potencialmente resistentes se utilizaron los cebadores CBF1 y CBR2 (Sierotzki y col., 2000; Ma y col., 2003; Delgado y col., 2013). Con este objetivo se extrajo el ADN genómico total de los aislados indicados en la Tabla 2 mediante el kit de extracción E.Z.N.A Plant Miniprep (Omega Bio-Tek, USA). A partir del ADN obtenido se siguió el protocolo descrito en Ma y col. (2003) y, una vez obtenidos los fragmentos parciales del gen citocromo b, éstos se purificaron y secuenciaron. Las secuencias obtenidas debidamente editadas se alinearon comparándolas entre sí y con las secuencias de referencia obtenidas en la base de datos GenBank: AF343069.1 y AF343070.1 correspondientes a aislados de *Mycosphaerella fijiensis* previamente identificados como resistente y sensible a QoI, respectivamente (Sierotzki y col., 2000).

Resultados y discusión

A partir de los experimentos realizados para el estudio de sensibilidad de aislados del hongo *M. nawae* a los fungicidas mancozeb y piraclostrobin, se pudo observar que todos los aislados crecidos en placas con fungicida presentaron una reducción de crecimiento miceliar respecto a aquellos que crecieron en placas con PDA (Figuras 2 y 3), por lo que dichos aislados mantienen buenos niveles de sensibilidad a ambos fungicidas y, por tanto, se podría descartar la aparición de resistencias.

Con el fungicida mancozeb, sólo tres aislados de 2015 (1, 13 y 21) pertenecientes a dos parcelas diferentes presentaron un crecimiento superior al esperado (superior al 70% respecto al control en al menos doce de las dieciséis medidas realizadas). En el caso de los aislados enfrentados a la materia activa piraclostrobin, seis aislados, también de 2015 (6, 10, 55, 63, 75 y 76), pertenecientes a seis parcelas diferentes, cumplieron las condiciones de crecimiento miceliar indicadas. Además, no se observó ninguna asociación entre los aislados que mostraron este comportamiento y una mayor presión de tratamientos fungicidas en las parcelas de donde se obtuvieron. Estas condiciones no permiten asegurar la presencia de resistencias a los fungicidas estudiados pero, no obstante, en el caso del piraclostrobin se decidió realizar una comprobación adicional de la posible presencia de mutaciones asociadas con la resistencia a QoI.

Para ello se extrajo el ADN genómico total de los seis aislados que presentaron mayor crecimiento miceliar frente a piraclostrobin utilizándose los cebadores CBF1 y CBR2, y se obtuvieron fragmentos parciales del gen citocromo b, que fueron purificados y secuenciados. La comparación de estas secuencias con las secuencias de referencia obtenidas en la base de datos GenBank: AF343069.1 y AF343070.1, correspondientes a aislados de *M. fijiensis* resistente y sensible a QoI, respectivamente, reveló que ninguno de los aislados de *M. nawae* presentaba mutaciones asociadas con la resistencia a QoI.

Hay que comentar que en la literatura científica se han descrito tres sustituciones de aminoácidos en el gen del citocromo b en patógenos vegetales que se asocian la resistencia a los QoI:

- Cambio de glicina a alanina en la posición 143 (G143A).
- Cambiar de fenilalanina a leucina en la posición 129 (F129L).
- Cambio de glicina a arginina en la posición 137 (G137R).

Todos los G143A, G137R y F129L se basan en polimorfismos de nucleótido único en el gen del citocromo b. Además, hay que destacar que, en base al conocimiento

actual, los factores de resistencia (RF = ED50 * [cepa resistente] / ED50 [cepa sensible de tipo salvaje]) asociados con G143A son en la mayoría de los casos superiores a 100 y usualmente superiores a varios cientos, lo que no se detectó para ninguno de los aislados incluidos en nuestro estudio.

La ausencia de resistencias era esperable en el caso del mancozeb. El FRAC establece un sistema de clasificación de fungicidas en función del riesgo de la creación de resistencias a los mismos, basado en el riesgo intrínseco del propio fungicida, el riesgo que presenta el patógeno y el riesgo que presentan las prácticas culturales. Acorde a esta clasificación, el mancozeb se clasifica como un fungicida de contacto que actúa sobre diferentes actividades metabólicas, con bajo riesgo de creación de resistencias al mismo. Además, el mancozeb es uno de los fungicidas más utilizados en la gestión de resistencias combinado con otros productos, por lo que hoy en día se sigue considerando un fungicida muy importante para la gestión de las enfermedades de la parte aérea de los cultivos (Lodovica y col., 2010).

Por otro lado, en el FRAC el piraclostrobin está calificado como un fungicida que presenta un alto riesgo de creación de resistencias Es por ello que en el caso del piraclostrobin es muy importante seguir las recomendaciones de aplicación que se establecen, que incluyen la aplicación del fungicida en dosis e intervalos efectivos según las recomendaciones del fabricante, limitar el número total de aplicaciones dentro de un programa establecido de aplicación, ya sea solo o combinado con otros fungicidas, y, por último y especialmente importante, alternar la aplicación de los fungicidas del grupo de los QoI con otros fungicidas efectivos pertenecientes a otros grupos químicos.

Estas recomendaciones se ven reforzadas a nivel local con las que establece la Generalitat Valenciana en su Boletín de Avisos para el tratamiento de *M. nawae* en caqui a través de los Servicios Oficiales (www. agricultura.gva.es). Además, sugieren los modos de aplicación más adecuados: comenzar los tratamientos en aquellas parcelas con fenología más avanzada, realizar como máximo tres aplicaciones del fungicida durante el periodo de riesgo establecido, realizar como mucho dos aplicaciones del mismo grupo de fungicidas, no realizar dos aplicaciones seguidas con fungicidas del mismo grupo y no realizar ningún tratamiento fungicida a partir de junio (GVA, 2017).

Como conclusión, podemos decir que este trabajo demuestra que, hasta la fecha, mediante los análisis realizados no se detectan resistencias a fungicidas en la población de *M. nawae* estudiada. Esto confirma que se están siguiendo correctamente las recomendaciones establecidas para el control de *M. nawae* y que el mancozeb es una herramienta útil para una protección sostenible del caqui frente a este hongo.

Agradecimientos: Trabajo financiado por la empresa UPL Europe Ltd.

BIBLIOGRAFÍA

Bassimba D.D.M., Mira J.L., Sedano M.E., Vicent A. 2017. Control and yield loss modelling of circular leaf spot of persimmon caused by *Mycosphaerella nawae*. Annals of Applied Biology 170, 391-401.

Berbegal M., Armengol J. y García-Jiménez J. 2011. Evaluation of fungicides to control circular leaf spot of persimmon caused by *Mycosphaerella nawae*. Crop Protection 30, 1461-1468.

Berbegal M., Mora-Sala B. y García-Jiménez J. 2013. A nested-polymerase chain reaction protocol for the detection of *Mycosphaerella nawae* in persimmon. European Journal of Plant Pathology 137, 273-281.

Berbegal M., Pérez-Sierra A., Armengol J., Park C.S., y García-Jiménez J. 2010. First report of circular leaf spot of persimmon caused by *Mycosphaerella nawae* in Spain. Plant Disease 94, 374.

Delgado J.A., Lynnes T.C., Meinhardt S.W., Wise K.A., Gudmestad N.C., Bradley C.A., Markell S.G. y Goswami R.S. 2013. Identification of the mutation responsable for resistance to QoI fungicides and its detection in *Ascochyta rabiei* (teleomorph *Didymella rabiei*). Plant Pathology 62, 688-697.

Kwon J.H. y Park C.S. 2004. Ecology of disease outbreak of circular leaf spot of persimmon and inoculum dynamics of *Mycosphaerella nawae*. Research in Plant Disease 10, 209-2016.

Lodovica M., Tinivella F. Garibaldi A., Kemmitt G.M., Bacci L., y Sheppard B. 2010. Mancozeb. Past, present and future. Plant Disease, 94, 1-12.

Ma Z., Felts D. y Michailides T. 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. Pesticide Biochemistry and Physiology 77, 66-74.

Sierotzki H., Parisi S., Steinfeld U., Tenzer I., Poirey S. y Gisi U. 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. Pest Managament Science 56, 833-841.

Vicent A., Bassimba D.D.M., Intrigliolo D.S. 2011. Effects of temperature, water regime and irrigation system on the release of ascospores of *Mycosphaerella nawae*, causal agent of circular leaf spot of persimmon. Plant Pathology 60, 890-898.