



Confirmación de la resistencia del hongo *Ramularia collo-cygni* a fungicidas estrobilurinas en Argentina

Erreguerena I¹, Havis N², Marten Heick T³, Gorniak K², Quiroz F¹ y Carmona M⁴.

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.

²Scotland Rural College, Escocia.

³Aarhus University, Dinamarca.

⁴Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires, Argentina.

*Este trabajo forma parte del proyecto doctoral de Ignacio Erreguerena en la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias de Balcarce, Universidad Nacional de Mar del Plata.

El salpicado necrótico de la cebada (SNC) o mancha de la hoja por *Ramularia* es causada por el hongo *Ramularia collo-cygni*. Esta grave enfermedad, es considerada la principal limitante de la producción de cebada cervecera en todo el mundo.

Los síntomas del SNC consisten en pequeñas lesiones necróticas salpicadas sobre el limbo de las hojas, con halo clorótico, las cuales se visualizan principalmente desde floración (pueden iniciar sin halo, pero rápidamente lo desarrollan). En estadios avanzados, las lesiones se expanden y cubren toda la superficie foliar (Foto 1). Estos síntomas también se encuentran en el tallo y vainas foliares, y a veces alcanzan las espigas. Como resultado, la planta senesce anticipadamente, se torna susceptible al quebrado y se reduce drásticamente el rendimiento, pero sobre todo el calibre y peso de mil granos.



Foto 1. Sintomatología característica provocada por el hongo *Ramularia collo-cygni* en llenado de grano.

Ante la falta de variedades resistentes frente al SNC, el manejo de la enfermedad se basa casi exclusivamente en la utilización de fungicidas foliares y de semillas.

Los fungicidas que se aplican en cebada en Argentina pertenecen a las familias de : a) Inhibidores de la desmetilación (IDM), principalmente triazoles y triazolintiona, que afectan la síntesis del ergosterol en la membrana plasmática; b) Inhibidores de la quinona externa (IQe), químicamente estrobilurinas que inhiben la respiración mitocondrial al bloquear la cadena de transporte de electrones, inhibiendo el complejo III c) Inhibidores de la succinato deshidrogenasa (ISD), químicamente carboxamidas que inhiben la respiración mitocondrial al bloquear la cadena de transporte de electrones, inhibiendo el complejo II. En otros países además se utiliza

fungicidas multisitios como el clorotalonil, folpet o mancozeb que actúan en múltiples sitios de acción dentro de la célula fúngica.

Ramularia collo-cygni, es internacionalmente considerado por el Comité de Acción para la Resistencia a Fungicidas (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC por sus siglas en inglés) como un patógeno de alto riesgo a generar resistencia ante fungicidas como consecuencia de su alta variabilidad genética.

De acuerdo con la experiencia europea, hacia fines de la década de 1990 el SNC fue inicialmente controlada con aplicaciones de estrobilurinas en los últimos estadios del cultivo. Al cabo de unas pocas campañas agrícolas, las primeras “fallas” de control fueron evidentes. Luego, investigadores europeos comprobaron que estas “fallas” se debieron a la existencia de cepas o razas de *R. collo-cygni* resistentes a las estrobilurinas. La primera molécula que perdió efectividad fue azoxistrobina por haber sido la más usada y recomendada. Una simple sustitución de un solo aminoácido (glicina por alanina) en la posición número 143 del gen que codifica para el citocromo b, integrante del complejo enzimático III, ubicado en la membrana mitocondrial, fue el responsable de la generación de este elevado nivel de resistencia cualitativa que terminó afectando a todas las estrobilurinas. Debido a este historial, Rcc se considera un patógeno de muy alto riesgo en términos de resistencia a otros grupos de fungicidas monositio específicos, a tal punto que en Alemania y Reino Unido ya se han reportado aislados de Rcc resistentes a todas las moléculas fungicidas monositio utilizadas (triazoles, carboxamidas, estrobilurinas), demostrando la existencia de una resistencia de tipo múltiple.

Bajo este complejo y riesgoso escenario, el objetivo de este trabajo fue el de relevar el estado de sensibilidad de poblaciones de Rcc y analizar la presencia de mutaciones puntuales en sitios de acción de los fungicidas más utilizados en el control del salpicado necrótico de la cebada en Argentina.

Este trabajo confirma por primera vez en Latinoamérica que los aislados de la población argentina de *R. collo cygni* albergan sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a los fungicidas estrobilurinas.

Confirmación de identidad de los aislados de *Ramularia collo-cygni*

Se obtuvieron 21 aislados de *R. collo cygni* del año 20012, 2015 y 2017 de lotes de producción de las localidades de Balcarce, Necochea, Pergamino, Tandil, Tres arroyos entre otras. Para constatar su identidad (especie) se realizó un diagnóstico molecular. **Todos los aislados analizados correspondieron a *R. collo-cygni*.**

Ensayos de sensibilidad a fungicidas

Se realizó un ensayo de sensibilidad a seis ingredientes activos utilizados en las formulaciones registradas para este patógeno: **azoxistrobina (IQe), epoxiconazol (IDM), prothioconazol (IDM), fluxapyroxad (ISD), isopyrazam (ISD) y clorotalonil** (multisitio). Por medio del método de espectrofotometría en placas de micro-titulación y el ajuste de modelos de regresión) se calculó la concentración inhibitoria del 50 % (CI₅₀) que es aquella concentración capaz de inhibir o matar al 50% del hongo. Asimismo, se estudiaron la presencia de mutaciones en los genes *cytb*, *cyp51* y en los genes de las subunidades B y C de la succinato deshidrogenasa (*sdhB* y *C*).

Al comparar la efectividad de las moléculas estudiadas entre años 2015-2017, se ha observado una **clara reducción de los niveles de sensibilidad de Rcc en general**. Con el Isopyrazam, el epoxiconazole y la azoxistrobina se observaron las mayores reducciones de sensibilidad siendo estos de los fungicidas de más tiempo de utilización en cebada en el país.

Los resultados muestran que el mayor valor de CI50 correspondió a la molécula azoxistrobina indicando una pérdida de efectividad en el control de Rcc.

Análisis de mutaciones en genes relacionados a los sitios de acción de fungicidas

En el caso del gen *cytb* se observó la presencia de la mutación G143A en el 100% de la población, lo que indica una **resistencia total a estrobilurinas** en general. Esto complementa y fundamenta la CI50 alta obtenida con la azoxistrobina.

En el casos de los genes de las subunidades B y C de la succinato deshidrogenasa, objetivo de las carboxamidas, se observaron dos mutaciones presentes, respectivamente. Esto probablemente explicaría una reducción de sensibilidad en alguna de las carboxamidas constatada en los resultados, aunque restan más estudios para confirmarlo.

Respecto a los triazoles, se observaron varios tipos de mutaciones en el gen *cyp51* que si bien no indican resistencia o pérdida de sensibilidad serían probablemente las responsables de la disminución de la fungitoxicidad de estas moléculas en el tiempo y un paso previo y necesario para lograr la resistencia a esas moléculas. Se continuarán con las investigaciones.

En el caso del clorotalonil, no se observaron cambios significativos en las poblaciones. En Argentina, dicha molécula no está registrada para cebada por lo que solo se incluyó en este estudio por cuestiones de investigación.

Todos estos hallazgos explican porque los productores y técnicos locales vienen observando hace tiempo que la eficiencia de control de los fungicidas para esta enfermedad se redujo o, como en el caso de las estrobilurinas, se perdió por completo.

El desafío por delante para manejar esta enfermedad es muy complejo, y es necesario establecer urgentemente prácticas anti-resistencia ya que se trata de un hongo que es capaz de vencer a todos los mecanismos de acción conocidos con excepción de los de acción multisitio.

Consideraciones finales

Este es el primer reporte en Latinoamérica de resistencia a estrobilurinas por presencia de la mutación G143A en el gen *cytb* de las poblaciones argentinas de *Ramularia collo-cygni*.

Agradecimientos: a todos los colegas que nos enviaron muestras de cebadas. A Mirta Kiehr. Al grupo Patología Vegetal de la EEA Balcarce. Fitopatología EEA Pergamino. Lab. de Mejoramiento y calidad, EEA Bordenave. Maria Stanisz-Migal y Jeannette Taylor (SRUC).