

## PERONOSPORA HYOSCYAMI F. SP. TABACINA. VARIABILIDAD DE LA SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS SISTÉMICOS. III

Berta Lina Muiño García<sup>1</sup> y Yordanka González Guardiola<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, C. P. 11600, bertam@inisav.cu

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera El Tumbadero Km 8½, San Antonio de los Baños, La Habana

### RESUMEN

En las campañas de tabaco 2002-2003 y 2003-2004 se realizó un estudio en condiciones de laboratorio para determinar la sensibilidad de *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* a los fungicidas sistémicos metalaxil, iprovalicarb, azoxystrobin y dimetomorf, y se colectaron aislamientos de diversas regiones tabacaleras en las provincias de Holguín, Ciego de Ávila, Cienfuegos, Matanzas, La Habana y Pinar del Río. Se utilizó el método de discos de hojas flotantes, y demostró la resistencia al metalaxil en el aislamiento LP0303 ( $DL_{50} = 21,27$ ), LP0304 ( $DL_{50} = 3,57$ ) y LP0305 ( $DL_{50} = 2,19$ ) moderadamente resistente al fungicida. El resto de los aislamientos fueron sensibles al metalaxil, y todos lo fueron a los fungicidas dimetomorf, iprovalicarb y azoxystrobin.

Palabras claves: *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*, sensibilidad, fungicidas

### ABSTRACT

A study under laboratory conditions was conducted during 2002-2003 and 2003-2004 tobacco crop seasons in order to determine the sensitivity of *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* to systemic fungicides metalaxyl, iprovalicarb, azoxystrobin and dimetomorph. In that way isolates from several tobacco growing regions in the provinces of Holguín, Ciego de Ávila, Cienfuegos, Matanzas, La Habana and Pinar del Río were collected. The floating leaf discs was utilized and it was demonstrated a moderate resistance to metalaxyl in the isolates LP0303 ( $DL_{50} = 21,27$ ), LP0304 ( $DL_{50} = 3,57$ ) and LP0305 ( $DL_{50} = 2,19$ ). The rest of the isolates were sensitive to metalaxyl, while all tested isolated were sensitive to dimetomorph, iprovalicarb and azoxystrobin.

Key words: *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*, sensitivity, fungicides

### INTRODUCCIÓN

La aparición de la forma epidémica de la enfermedad moho azul, causada por el hongo *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* en 1979 en Cuba [Pérez, 1983], obligó a la búsqueda de nuevos compuestos recién introducidos en el mercado, entre los que se destacan los fungicidas pertenecientes a la familia de las fenilaminas, incluido el metalaxil, los cuales tienen una alta selectividad y un fuerte efecto preventivo y curativo contra hongos pertenecientes al orden Peronosporales [Schwinn y Urech, 1986].

Este compuesto comenzó a utilizarse en la producción tabacalera en el país en 1980 [Minag, 1983], y gracias a su uso se redujeron de forma sustancial los elevados niveles de infección que existían en las diferentes áreas donde se cultivaba el tabaco con afectaciones por el moho azul.

Posteriormente aparecieron en el mercado diferentes grupos de fungicidas con actividad sistémica como el

dimetomorf (CME 151), con fuerte acción contra los hongos pertenecientes al orden Peronosporales, el cual ejerce su efecto sobre poblaciones de hongos resistentes a las fenilamidas [Albert *et al.*, 1988; 1995; Köller, 1993; Li *et al.*, 1995]; el azoxystrobin, que muestra una actividad eficiente contra la mayoría de los *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes* y *Oomycetes* [Köller, 1993]; el iprovalicarb, que manifiesta una elevada eficacia por su acción de protección curativa y erradicativa frente a las enfermedades causadas por hongos pertenecientes a la familia *Oomycetes* [Agris, 2005].

En Cuba, con solo cuatro años de aplicación del metalaxil, se observaron las primeras evidencias de resistencia en áreas tabacaleras de la provincia de Holguín, con porcentajes elevados de aislamientos resistentes durante la campaña 1985-1986. Ya en la campaña 1987-1988 se detectaron poblaciones del hongo resistentes

en las zonas occidentales y en Ciego de Ávila, en la región central [Muiño *et al.*, 1990a].

A partir de la campaña 1986-1987 se tomaron importantes medidas que incluyeron la reducción de los tratamientos foliares con metalaxil, se eliminaron las aplicaciones al suelo en semilleros en todas las regiones tabacaleras del país y se adoptó el sistema de pronóstico propuesto por Rodríguez *et al.* (1984). El empleo de este sistema permitió realizar solamente aplicaciones de fungicidas a partir de la señal emitida de períodos favorables para el desarrollo de la enfermedad. Otra de las medidas fue el tratamiento con metalaxil mezclado con ditiocarbamatos en las áreas donde solo se presentaba la enfermedad, medida que ayudó a reducir la presión de selección y se adoptó el sistema de monitoreo de la resistencia [Muiño, 1997], que permite un manejo adecuado de los fungicidas y de las poblaciones resistentes.

La resistencia de los hongos a productos químicos constituye un punto esencial en la presencia de determinadas razas del hongo. Este fenómeno se manifiesta por una reducción de la sensibilidad a los productos químicos, y esas características se transmiten genéticamente [Serres y Carrazo, 1976].

En el presente trabajo se persiguió como objetivo determinar la sensibilidad de diferentes aislamientos de *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* a los fungicidas sistémicos metalaxil, iprovalicarb, azoxystrobin y dimetomorf.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante las campañas de tabaco 2001-2002 y 2002-2003 se realizaron muestreos en diferentes zonas tabacaleras del país, en las provincias de Pinar del Río, La Habana, Matanzas, Cienfuegos, Ciego de Ávila y Holguín, para obtener los diferentes aislamientos del hongo *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*.

Se colectaron al azar hojas de tabaco con lesiones de la enfermedad y esporulaciones activas del hongo por cada foco existente, y se preparó un inóculo a partir de hojas con esporulaciones frescas y activas del hongo. Con un pincel se colectaron los esporangios y se suspendieron en agua destilada estéril. La concentración se ajustó entre  $1-5 \times 10^4$  esporangios/mL mediante conteo en la cámara de Neubauer.

Para la determinación de las líneas de base de sensibilidad se empleó el método modificado de discos de hojas

descrito por Muiño *et al.* (1990b), el cual consiste en el cultivo de plantas sanas de tabaco var. corajo en condiciones de laboratorio. De las hojas de las plántulas se cortaron discos de 1 cm de diámetro y se colocaron en placas de Petri de 7 cm de diámetro en flotación sobre soluciones de los fungicidas a diferentes concentraciones. Se ensayaron diez réplicas a las concentraciones de 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1,5; 10,0 y 100 mg i.a./L de metalaxil, iprovalicarb, azoxystrobin y dimetomorph, además de la réplica testigo con agua destilada estéril. La evaluación se realizó a los doce días posteriores a la inoculación y se dedujo el porcentaje del área de la hoja con presencia de esporulaciones basado en el área total para cada réplica. Se calculó la media del porcentaje de mortalidad por concentración, los que se transformaron a unidad de Probit [Bliss, 1935], y los datos de concentración a logaritmo de la concentración. Se ajustó una ecuación de regresión, y a partir de la línea de regresión se determinó el valor correspondiente a la  $DL_{50}$ . Todo este procedimiento se realizó mediante un programa computarizado. Se calculó además el factor de resistencia (FR) a partir de la relación entre las  $DL_{50}$  calculadas y las  $DL_{50}$  de referencia obtenidas para cepas sensibles conocidas, que es de 0,01 mg i.a./L [Muiño *et al.*, 2007].

Con los valores de  $DL_{50}$  se compararon los aislamientos mediante un análisis bifactorial de 1X1 con test de significación de Newman Keuls al 5%, y se agruparon en diferentes categorías de acuerdo con el valor de la  $DL_{50}$  obtenido, según se describe a continuación:

Símbolo	Categoría	$DL_{50}$
S	Sensible	<1 mg i.a. • L <sup>-1</sup>
MR	Medianamente resistente	1-5 mg i.a. • L <sup>-1</sup>
R	Resistente	10-20 mg i.a. • L <sup>-1</sup>
AR	Altamente resistente	50-100 mg i.a. • L <sup>-1</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los fungicidas evaluados solo hubo resistencia al producto fungicida metalaxyl (*Tabla 1*), los cuales coinciden en su procedencia de la provincia de La Habana en la campaña 2002-2003.

El aislamiento LP0303 resistente al producto presenta el valor de  $DL_{50}$  más elevado, seguido por los aislamientos LP0304 y LP0305, considerados como moderadamente resistentes, y que presentan valores de  $DL_{50}$  de 3,17 y 2,19, respectivamente. En el resto de los aislamientos estudiados no hubo resistencia al metalaxyl. Estos resultados confirman la presencia de poblaciones resistentes al fungicida, aunque es importante destacar que en seis aislamientos se demuestra sensibili-

dad, factores de resistencia por debajo de 10 en el resto, en siete se comprobó altos niveles de resistencia; de estos cuatro por debajo de 100, y tres aislamientos por encima de 100, lo que indica una resistencia muy elevada. Es decir, que con la presencia de poblaciones en el campo con estas características, aun cuando el metalaxil ha sido reducido, se evidencia la presencia de poblacio-

nes que se han establecido de manera importante en condiciones de la naturaleza, de ahí la necesidad de introducir otras moléculas con diferentes mecanismos de acción en las estrategias de manejo de las poblaciones resistentes al metalaxyl. Los resultados coinciden con los obtenidos por Muiño (1997), quien destaca poblaciones resistentes al metalaxyl en todas las provincias del país.

**Tabla 1. Sensibilidad de los aislamientos al fungicida metalaxyl**

Aislamiento	Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>	DL <sub>50</sub>	FR	Categoría
H 01	y = - 1,4137x + 1,7517	0,8827	0,01	1	S
C02	y = - 1,3534x + 3,1470	0,8483	0,04	4	S
M02	y = - 0,7752x + 4,5737	0,9380	0,28	28	S
LP02	y = - 0,6537x + 4,1046	0,7763	0,04	4	S
S02	y = - 0,5169x + 4,7287	0,7204	0,30	3	S
LP0301	y = - 1,2649x + 2,4739	0,7593	0,01	1	S
LP0302	y = - 0,7600x + 4,7438	0,9787	0,46	46	S
LP0303	y = - 0,4112x + 5,5460	0,7705	21,27	2127	R
LP0304	y = - 0,5521x + 5,3054	0,8680	3,57	357	MR
LP0305	y = - 0,5267x + 5,1796	0,8297	2,19	219	MR
PR0301	y = - 0,4697x + 4,9698	0,6630	0,86	86	S
PR0302	y = - 1,3581x + 2,2085	0,7523	0,01	1	S
CA0301	y = - 0,7504x + 4,9424	0,9643	0,84	84	S

Para el fungicida dimetomorph no existen aislamientos resistentes al producto. Los valores de DL<sub>50</sub> demuestran

sus sensibilidades (Tabla 2). Actualmente se aplica en la producción con una elevada efectividad.

**Tabla 2. Sensibilidad de los aislamientos frente al fungicida dimetomorph**

Aislamiento	Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>	DL <sub>50</sub>	FR	Categoría
H 01	y = - 1,5932x + 1,4512	0,8873	0,01	1	S
C02	y = - 1,4857x + 1,9970	0,8627	0,01	1	S
M02	y = - 1,4253x + 2,4548	0,8960	0,02	2	S
LP02	y = - 1,6942x + 1,5256	0,8492	0,01	1	S
S02	y = - 1,5154x + 2,1501	0,8393	0,01	1	S
LP0301	y = - 1,5026x + 1,8109	0,9114	0,01	1	S
LP0302	y = - 1,5864x + 1,8502	0,9224	0,01	1	S
LP0303	y = - 1,5351x + 1,7900	0,9134	0,01	1	S
LP0304	y = - 1,5296x + 1,8184	0,9132	0,01	1	S
LP0305	y = - 1,5679x + 1,4329	0,8858	0,01	1	S
PR0301	y = - 1,5925x + 1,4223	0,8859	0,01	1	S
PR0302	y = - 1,5723x + 1,5963	0,8908	0,01	1	S
CA0301	y = - 1,5569x + 2,1007	0,8681	0,01	1	S

Los valores de  $DL_{50}$  para el fungicida iprovalicarb muestran también sensibilidad de todos los aislamientos a este producto químico (Tabla 3).

Similar comportamiento se vio en los aislamientos en el caso del azoxystrobin. Ninguno de ellos mostró resistencia, dado por los valores de  $DL_{50}$  obtenidos (Tabla 4).

**Tabla 3. Sensibilidad de los aislamientos al fungicida iprovalicarb**

<i>Aislamiento</i>	<i>Ecuación de regresión</i>	$R^2$	$DL_{50}$	<i>FR</i>	<i>Categoría</i>
H 01	$y = -1,4565x + 2,3727$	0,9393	0,01	1	S
C02	$y = -1,4630x + 1,7054$	0,9133	0,01	1	S
M02	$y = -1,4569x + 1,8748$	0,8802	0,01	1	S
LP02	$y = -1,4621x + 1,7859$	0,8996	0,01	1	S
S02	$y = -1,4744x + 1,8485$	0,8925	0,01	1	S
LP0301	$y = -1,6081x + 1,5968$	0,8698	0,01	1	S
LP0302	$y = -1,2442x + 2,5933$	0,7910	0,01	1	S
LP0303	$y = -1,6001x + 1,6091$	0,8516	0,01	1	S
LP0304	$y = -1,7641x + 1,8316$	0,8349	0,02	2	S
LP0305	$y = -1,5494x + 1,4662$	0,8729	0,01	1	S
PR0301	$y = -1,6081x + 1,5968$	0,8577	0,01	1	S
PR0302	$y = -1,6435x + 1,4684$	0,8810	0,01	1	S
CA0301	$y = -1,5945x + 1,4719$	0,8789	0,01	1	S

**Tabla 4. Sensibilidad de los aislamientos al producto fungicida azoxystrobin**

<i>Aislamiento</i>	<i>Ecuación de regresión</i>	$R^2$	$DL_{50}$	<i>FR</i>	<i>Categoría</i>
H 01	$y = -1,6745x + 1,6667$	0,8586	0,01	1	S
C02	$y = -1,4950x + 2,0515$	0,8555	0,01	1	S
M02	$y = -1,4897x + 2,0063$	0,8570	0,01	1	S
LP02	$y = -1,5368x + 2,0423$	0,8776	0,01	1	S
S02	$y = -1,5405x + 2,1023$	0,8641	0,01	1	S
LP0301	$y = -1,2676x + 3,1096$	0,8645	0,03	3	S
LP0302	$y = -1,5612x + 1,4203$	0,8866	0,01	1	S
LP0303	$y = -1,5636x + 1,4226$	0,8856	0,01	1	S
LP0304	$y = -1,6050x + 1,5676$	0,8644	0,01	1	S
LP0305	$y = -1,5955x + 1,5779$	0,8815	0,01	1	S
PR0301	$y = -1,2879x + 2,9834$	0,8959	0,03	3	S
PR0302	$y = -1,5589x + 1,9235$	0,9071	0,01	1	S
CA0301	$y = -1,4601x + 1,8680$	0,8807	0,01	1	S

Los factores de resistencia indican el nivel de pérdida de sensibilidad de un aislamiento de campo respecto a aislamientos salvajes, o normalmente sensibles a los fungicidas. Para el caso del metalaxil existen valores muy altos, por encima de 100 en algunos casos, que demuestran la alta resistencia de esas poblaciones aisladas de campos de tabaco, sometidas a tratamientos sistemáticos con el fungicida por tiempo prolongado; sin embargo, los valores obtenidos para el resto de los fungicidas estudiados resultaron bajos; por tanto, los aislamientos demuestran una sensibilidad normal a ellos, factibles de incluir como la medida más promisoriosa en las estrategias de control de las poblaciones de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*.

## CONCLUSIONES

- Se confirma la presencia de poblaciones resistentes al fungicida metalaxil en siete aislamientos, y en seis se demuestra sensibilidad. De ellos los de mayor nivel de resistencia son tres, procedentes de la provincia de La Habana: LP0303 ( $DL_{50} = 21,27$ ), LP0304 ( $DL_{50} = 3,57$ ) y LP0305 ( $DL_{50} = 2,19$ ).
- Todos los aislamientos resultaron sensibles al iprovalicarb, dimetomorf y azoxystrobin.

## REFERENCIAS

Agrios, G. N.: *Plant Pathology*, Department of Plant Pathology, University of Florida, Elsevier, Academic Press, Nueva York, 2005.

Albert, G.; J. Curtze; C. A. Drandarevski: «Dimethomorph (CME 151), a Novel Curative Fungicide», *Brighton Crop Protection Conference Pest and Diseases* Vol. 1, 1988, pp. 17-24.

Albert, G.; H. Heiner: «How Does Dimethomorph Kill Fungal Cells? A Time Lapse Video Study with *Phytophthora infestans*», Abstracts of

11<sup>th</sup> Int. Symposium on Modern Fungicides and Antifungal Compounds, Castle of Rheinhardsbinn, Thuringia, Alemania, 1995.

Bliss, C. I.: «The Calculation of Dosage Mortality Curve», *Ann. Appl. Biol.* 22:135-167, EE. UU., 1935.

Köller, W.: «Recent Progress in the Development of Fungicides and Future Prospects», 6<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology Council, Septiembre 12-18, Ottawa, Canadá, 1993.

Li, A. J.; S. F. Bagirova; M. Derenjgina; A. V. Dolgova; Y. Dyakov: «Dimethomorph Resistant Strains of *Phytophthora infestans*», XIII Int. Plant Prot. Conf. The Netherlands 200, Jul. 2-7. Holanda, 1995.

Minagri: *Instructivo técnico para el cultivo del tabaco*, t. I, Minag, Cuba, 1983.

Muiño, B. L.; A. Pollanco; M. Iglesias; I. Díaz; Z. Camps; D. Núñez; A. Jaens: «Comportamiento de la resistencia de *P. tabacina* al metalaxil en Cuba», *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Serie Tabaco* 13 (2):47-58, La Habana, 1990<sup>a</sup>.

Muiño, B. L.; A. Polanco; V. Monteagudo: «Plaguicidas. *Phytophthora infestans*. Determinación de resistencia a metalaxil», NRAG, Minag, Cuba, 1990b.

Muiño, B. L.: «Manejo de la resistencia a las fenilamidas en especies de Oomycetes en Cuba», tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Minag, Cuba, 1997.

Muiño B. L.; L. Pérez; A. Pollanco; Isabel Ponciano; M. E. Lorenzo, E. L. Martín; M. Á. González; R. Arévalo; M. Rodríguez; Y. Santana: «El monitoreo y manejo de la resistencia a los fungicidas en Cuba», *Fitosanidad* 11 (3):91-100, La Habana, 2007.

Pérez L.: «Moho azul del tabaco producido por *Peronospora hyoscyami* (*Peronospora tabacina*)», *Protec. de Plantas: Boletín de Reseñas*, La Habana, 1983.

Rodríguez, J.; Guadalupe Gómez; R. Trujillo: «Pronóstico a corto plazo del moho azul del tabaco en Cuba», *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Prot. de Plantas* 7 (4):103-116, La Habana, 1984.

Schwinn, F. J.; P. A. Urech: «Progress in the Chemical Control of Diseases Caused by Oomycetes. Fungicide Chemistry», *Advances and Practical Applications*, Cap. 5; Vol. 304, April 22, 1986, American Chemical Society, 1986, pp. 89-106.

Serres, J. M.; G. A. Carrazo: «DPX-3217, a New Fungicide for the Control of Grape Downy Mildew, Potato Late Blight and Other Pronosporales», *Meded. Fac. Landbouwwet, Riksuniv. Gent* 41:645-650, Bulgaria, 1976.