

HEREDABILIDAD DE LA RESISTENCIA DE LA ROÑA DEL MANZANO *Venturia inaequalis* (CKE) Wint. AL BENOMYL

Francisco Daniel Hernández Castillo¹
Luciana Parisi²

RESUMEN

La presente investigación se estableció con la finalidad de estudiar el determinismo genético de la resistencia de *V. inaequalis* al Benomyl. Se realizaron cruzamientos entre una cepa resistente (104) y tres cepas sensibles (101, 147 y 163). Se verificó la sensibilidad o resistencia de las cepas en medio malta agar, adicionado con 0.5 y 10 ppm de Benomyl. Los pseudotecios se obtuvieron en discos de hoja de manzano, colocados en cajas petri con agar agua mantenidas a temperaturas de 18° a 20° C., por 21 días y posteriormente a 8° C. Los pseudotecios se forman después de 140 días de realizados los cruzamientos. La heredabilidad de la resistencia se estudió a partir de 160 aislamientos monoascospóricos, los cuales muestran una segregación de tipo 1:1, que indica que la resistencia al Benomyl es heredada por la acción de un gen.

Palabras clave: *Venturia inaequalis*, resistencia a benzimidazoles, resistencia a fungicidas.

SUMMARY

The objective of this research was to study the inheritance of resistance to benomyl in *V. inaequalis*, the apple scab pathogen. Progeny from crosses among a resistant (104) and three susceptible strains (101, 147 and 163) were grown in malta agar with 0.5 and 10 ppm of benomyl to evaluate their susceptibility to the fungicide. Pseudothecia were obtained on apple leaf disks placed

1. Dr. Maestro-Investigador, Depto. de Parasitología, Div. de Agronomía. UAAAN.

2. Dra. Investigador del Centro de Patología Vegetal del INRA de Angers. Francia.

on water agar plate, inoculated with two *V. inaequalis* strains, incubated for 21 days at 18-20° C and then transferred to 8° C. Using this methodology, crosses produced pseudothecia within 140 days. Inheritance of resistance to benomyl based on 160 monosporic isolates was monogenic as determined by the 1:1 segregation rate of this trait in examined progeny.

Key words: *Venturia inaequalis*, Benzimidazole resistance. Resistance to fungicides.

INTRODUCCIÓN

La roña del manzano, ocasionada por *Venturia inaequalis* es una de las enfermedades más importantes que afectan a este frutal, ya que se presenta en todos los países donde se le cultiva. Su ataque es más severo en regiones con primaveras y veranos fríos y húmedos y puede estar ausente en climas secos y cálidos (Agrios, 1978). Este patógeno afecta a todos los órganos herbáceos del manzano. Sus ataques son frecuentes durante todo el ciclo vegetativo del árbol, pues afecta las hojas, las flores, y los frutos; puede ocasionar pérdidas de hasta 100% debido a que ocasiona una disminución cualitativa y cuantitativa de la producción (Cepeda y Hernández, 1986). El control químico de la enfermedad se realiza en la fase saprofítica y parasítica del hongo. Los fungicidas para atacarlo se emplean en forma preventiva y/o curativa. Los productos de la familia de los benzimidazoles, dentro de los que se encuentra el Benomyl, fueron comercializados a partir de 1968 para aplicarlos contra *V. inaequalis*. Su acción efectiva permite que estos fungicidas se empleen continuamente a un ritmo de 10 a 14 días con propósitos implícitos de prevención y curación (Martín, 1982). La consecuencia de la utilización intensiva del Benomyl fue la aparición de cepas de *V. inaequalis*, resistentes después de 3 a 4 años de aplicarse. Las primeras cepas resistentes surgieron desde 1970, en Australia (Wicks, 1974); posteriormente, en 1976, en Estados Unidos y en Nueva Zelanda. En años siguientes se reportan cepas resistentes en Polonia, Francia, África del Sur, Alemania, Israel, Chile y Canadá (Novacka *et al.*, 1977; Olivier, 1979; Shwabe, 1979; Kiebacher y Hoffmann, 1981; Shabi *et al.*, 1983; Stanis y Jones, 1984 y Northover, 1986). Los análisis de las poblaciones de *V. inaequalis* en relación con su sensibilidad a los fungicidas, ha permitido detectar la existencia de cepas que poseen un factor de resistencia superior a 1000 (Kiebacher y Hoffmann, 1981). Este factor de resistencia se puede mantener estable en la descendencia del patógeno, si la resistencia es de tipo monogénica, o puede aumentar o decrecer si la resistencia es heredada en forma poligénica. Dada esta situación, el objetivo de la presente investigación fue estudiar el determinismo genético del factor de resistencia de *V. inaequalis* al Benomyl.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas de Angers, Francia. Las cepas utilizadas en este estudio proceden de aislamientos monospóricos, realizados por el laboratorio de micología. Se utilizó una cepa resistente al fungicida (104), aislada de un huerto comercial, que presenta una concentración inhibidora de 50 de 250 ppm y tres cepas sensibles (101, 147 y 163). La sensibilidad o la resistencia de estas cepas al Benomyl se verificó en medio extracto de malta (1%), agar (1.5%) adicionado con 0 ppm, 5 ppm y 10 ppm de Benomyl (Benlate 50% PH^A). Cada cepa se incrementó en medio malta (1%) agar (1.5%) a 16°C durante tres semanas. Al término de este tiempo se realizaron los cruzamientos entre una cepa sensible y una cepa resistente al Benomyl, por una mezcla de las dos cepas en forma de conidias y de fragmentos miceliares, en una suspensión de agua destilada, estéril (proporción 1:1 volumen). De esta suspensión se tomaron 0.075 ml con una pipeta automática y se depositaron al centro de discos de hojas de manzano, de la variedad Golden Delicious, en cajas Petri con agar (1.5%), adicionado con una solución de antibióticos (aureomicina 100 mg; penicilina 250 mg y estreptomycin 500 mg, en 100 ml de agua destilada, estéril, a razón de 5 ml de la solución por un litro del medio de cultivo). Enseguida, los medios se incubaron a una temperatura de 18 a 20°C durante 21 días, para permitir un crecimiento micelial importante; posteriormente, los medios se colocaron a 8°C para inducir la formación de los pseudotecios con ascas y ascosporas. Una vez que los pseudotecios presentaron ascosporas maduras, se realizaron aislamientos monoascospóricos. Estos se obtuvieron tomando un pseudotecio maduro del disco de hoja de manzano, el cual se colocó en un portaobjetos estéril con una gota de agua destilada estéril; enseguida el pseudotecio se presionó con una varilla de vidrio con punta chata, lo cual provocó la salida de las ascas y ascosporas. La gota que contenía las ascosporas libres (fuera del asca), se deslizó y depositó al centro de una caja de Petri, con medio malta (1%) agar (2%), y se dejó incubar por 24 a 36 hr a 16°C. Al término de este tiempo se colocó la caja Petri bajo un microscopio estereoscópico, con un aumento 10x, y con una aguja de disección se procedió a realizar los aislamientos monospóricos. Para este proceso se tomaron al azar las ascosporas que presentaban un tubo germinativo, que no estuviera en contacto con el de otra ascospora. Los aislamientos se incubaron durante tres semanas en medio malta (1%) agar (1.5%) a 16°C. Al cabo de este tiempo se hizo una colección de los aislamientos en tubos de ensayo con medio malta (3%), agar (1.5%), que se incubaron a 16°C, durante tres semanas. Así mismo, se tomaron explantes de cada aislamiento, de 4mm de diámetro (marcados con un sacabocado), y se colocaron en medio de malta (1%), agar (1.5%), con 0 ppm, 5 ppm y 10 ppm, de Benomyl. Los medios se incubaron por cuatro semanas, a 16°C. Al término de este tiempo se efectuó una lectura, para determinar el número de aislamientos resistentes y el número de aislamientos sensibles al fungicida; las cepas resistentes pre-

sentaron un crecimiento micelial en los medios adicionados con el fungicida, mientras que las cepas sensibles no mostraron ningún crecimiento. Los resultados se evaluaron mediante la prueba de X^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bajo las condiciones en que se desarrolló la presente investigación, los pseudotecios con ascas y ascosporas maduras de *V. inaequalis*, se formaron después de 140 días de realizados los cruzamientos. Este resultado concuerda con los obtenidos por Keitt y Langford (1941), Ross (1961), Ross y Hamlin (1962), quienes señalan que los pseudotecios de *V. inaequalis* alcanzan su desarrollo completo en un período que va de cuatro a los seis meses, si se mantienen a 8°C. Los resultados referentes a la heredabilidad de la resistencia de *V. inaequalis* al Benomyl, se obtuvieron a partir de 160 aislamientos monoascospóricos obtenidos de los cruzamientos 104 x 101, 104 x 147, y 104 x 163, con 82, 45 y 33 aislamientos de cada cruce, respectivamente. Los resultados obtenidos (Cuadro 1) muestran que en los tres cruzamientos (resistentes por sensibles) la progenie segrega, en una proporción de tipo 1:1 (resistente: sensible). Esto implica que la resistencia de *V. inaequalis* al Benomyl, es determinada por la acción de un solo gen Mendeliano. Resultados similares fueron obtenidos por Kiebach y Hoffmann (1981), Martin et al. (1982), y Stanis y Jones (1984).

Cuadro 1. Segregación de la descendencia de *Venturia inaequalis* por su resistencia-susceptibilidad al Benomyl que se obtuvo de cruzamientos entre cepas sensibles y una cepa resistente al fungicida.

Cruzamientos	Descendencia ¹		Valor ² X ²	Segregación de tipo
	r	s		
104 x 101	38	44	0.44	1:1
104 x 147	19	26	1.08	1:1
104 x 163	18	15	0.28	1:1

1. r = Resistencia al Benomyl.

s = Susceptible al Benomyl.

2. El valor esperado al nivel de 5% de significancia es 3.84

Dado que de entre los productos curativos empleados ampliamente para el control de la roña del manzano, se encuentran el Benomyl, el Carbendazim, el Thiabendazol y el Tiofanatometílico, los tres primeros pertenecientes al grupo de los benzimidazoles y el último al de los tiofanatos, y que todos ejercen su acción bloqueando las divisiones nucleares y celulares del patógeno, se puede presentar una resistencia cruzada positiva entre ellos (Leroux, 1987). Así, desde el punto de vista del control químico de la enfermedad, el contar con una población de *V. inaequalis* con resistencia monogénica al Benomyl implica que, de no tomarse las medidas correctivas apropiadas en el uso de los fungicidas benzimidazoles y tiofanatos, antes y al detectarse las primeras cepas resistentes, la totalidad de la población del patógeno se puede tornar resistente rápidamente. Esta resistencia se observará de manera práctica en el campo, sólo cuando los fungicidas concernientes presenten una pérdida de eficiencia significativa, aun y cuando las aplicaciones se realicen correctamente, es decir, en el momento oportuno, con la dosis indicada y la cantidad de agua apropiada.

CONCLUSIONES

1. La resistencia de *Venturia inaequalis* al Benomyl es heredada por la acción de un gen.

LITERATURA CITADA

- Agrios, N.G. 1978. Plant pathology. Academic Press, New York. 703 p.
- Cepeda, S.M. y F.D. Hernández. 1986. La roña del manzano *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Folleto de Divulgación. Vol.1 N° 11. 16 p.
- Keitt, G.M. y M.H. Langford. 1941. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. I. A groundwork for genetic studies. Am. J. Bot. 28:805- 819.
- Kiebacher, J. y G.M. Hoffmann. 1981. Zur genetik der benzimidazol- resistenz bei *Venturia inaequalis*. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 88:189-205.
- Leroux. P. 1987. La résistance des champignons aux fongicides I. Phytoma 385:6-14.
- Martin, D., J.M. Olivier y Y. Lespinasse. 1981. Obtention *in vitro* de périthèces de *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.,; aplicación á l'analyse de la résistance au benomyl acquise au verger. Agronomie 9:745-750.

- Martin, D. 1982. Contribution à l'étude du pouvoir pathogène et de la résistance au benomyl de *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint: Compétition entre biotypes et hérédité des caractères. Thèse 3ème cycle, Paris XI, Orsay, Francia.
- Northover, J. 1986. Characterization and detection of benomyl resistant *Venturia inaequalis* in Ontario apple orchards. Can. J. Plant Pathol. 8: 117-122.
- Novacka, H., W. Karolczak y D.F. Millikan. 1977. Tolerance on the apple scab fungus to the benzimidazole fungicides in Poland. Plant Dis. Rep. 61: 346-350.
- Olivier, J.M. 1979. Observations sur les souches de tavelure du pommier et du poirier résistantes aux benzimidazoles. Ann. Phytopathol. 11-1: 135.
- Ross, R.G. 1961. The effect of certain elements with emphasis on nitrogen, on production of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Can. J. Bot. 39:731-738.
- Ross, R.G. y S.A. Hamlin. 1962. Production of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. on sterile apple leaf discs. Can J. Bot. 43:629-635.
- Schwabe, W.S. 1979. Resistance of apple scab fungus *Venturia inaequalis* to benzimidazole fungicide. The Deciduous Fruit Grower. 418-422.
- Shabi, E., T. Katan y K. Marton. 1983. Inheritance of resistance to benomyl in isolates of *Venturia inaequalis* from Israel. Plant Pathol. 32:207-211.
- Stanis, V.F. y A.L. Jones. 1984. Genetics of benomyl resistance in *Venturia inaequalis* from North and South America, Europe, and New Zeland. Can J. Plant Pathol. 6:283-290.
- Wicks, T. 1974. Tolerance of apple scab fungus to benzimidazole fungicides. Plant Dis. Rep. 58:886-889.