



Confirmación de multiresistencia a fungicidas carboxamidas, estrobilurinas y cyproconazole del agente causal de la mancha en red (*Pyrenophora teres f. teres*) en Argentina

Causas y recomendaciones de manejo

Dr. Carmona Marcelo & Dr. Sautua Francisco

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Cátedra de Fitopatología

Resumen : En este trabajo se informa por primera vez en América la resistencia de cepas de *Pyrenophora teres* a carboxamidas, estrobilurinas y al triazol cyproconazole. Se discuten las causas de su origen y se proponen recomendaciones para su manejo. Se requiere una rápida implementación de medidas anti-resistencia

La mancha en red (MR) constituye una de las principales enfermedades de los cultivos de cebada del Cono Sur. En Argentina, la MR aparece en todas las regiones donde se cultiva este cereal y, desde los primeros estadios fenológicos, provoca pérdidas de rendimiento estimadas en un 20% en promedio. Entre los componentes más afectados se encuentran el peso de los granos y el número de granos por metro cuadrado. El patógeno causante de la MR también causa la disminución del extracto de malta, lo que afecta la calidad maltera para la producción de cerveza.

El uso de fungicidas es una práctica muy común y recomendada en lotes donde la enfermedad ya está presente alcanzando un nivel de daño que justifique el control químico. Como sucede con el agente causal de la mancha amarilla (*Pyrenophora tritici-repentis*), la aparición de cepas de *Pyrenophora teres* (*Pt*, agente causal de la mancha en red de la cebada) resistentes a diferentes mecanismos de acción, constituye una preocupación mundial que requiere inmediato abordaje.

Ingredientes activos fungicidas para el cultivo de cebada actualmente en uso en Argentina

Actualmente, los ingredientes activos (i.a.) fungicidas disponibles y en uso en Argentina para el manejo químico de enfermedades de la cebada incluyen mezclas de i.a. inhibidores de la quinona externa (QoI) (químicamente estrobilurinas), inhibidores de la desmetilación (DMI) (químicamente triazoles) e inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHI) (químicamente carboxamidas). A lo largo de los años, y debido al aumento de la presión de enfermedades foliares, el número y la frecuencia de aplicaciones con mezclas de QoI + DMI y de mezclas con SDHI ha aumentado considerablemente. Si bien el aumento del uso de fungicidas ocurrió en todas las moléculas descriptas, el uso de las carboxamidas en cebada merece una discusión especial. Desde el resurgimiento de epidemias destructivas de *Ramularia collo-cygni* (*Rcc*) en 2012, las moléculas SDHI con alta eficiencia de control de este patógeno, empezaron a ocupar un lugar privilegiado dentro de los programas de control químico en cebada. De esta forma, el lanzamiento de carboxamidas en mezclas con otros principios activos siguió un progreso ininterrumpido: isopyrazam (2012), fluxapyroxad (2014), bixafen (2015) y pydiflumetofen (2019). El tratamiento de semilla con carboxamidas comenzó en 2011 con sedaxane en mezclas con otros fungicidas. Posteriormente, desde 2017, la mezcla de fluxapyroxad en mezcla con triticonazole comenzó a ser el principal protagonista de la mayoría de las hectáreas de cebada sembradas, con resultados exitosos en el control de varios patógenos de cebada transmitidos por semilla, entre los cuales se incluyen a *Pt*, *Rcc* y *Bipolaris sorokiniana*.

Presentación del problema

Durante las últimas dos campañas agrícolas, numerosos lotes mostraron síntomas de MR con inesperados y altos niveles de severidad foliar (Fotos 1, 2, 3 y 4), a pesar de haber recibido hasta 2-3 aplicaciones con fungicidas incluyendo estrobilurinas, azoles y carboxamidas en su formulación. Inmediatamente se planteó la hipótesis de la pérdida de sensibilidad de cepas de *Pt* a las moléculas involucradas.

Con el objeto de confirmar la etiología de las manchas y la posible pérdida de sensibilidad de los patógenos involucrados a los fungicidas, se procedió a muestrear plantas representativas de cada lote objeto de sospecha. Los resultados de la incubación arrojaron la esporulación de *Pt* en síntomas típicos de MR en todas las muestras recolectadas.

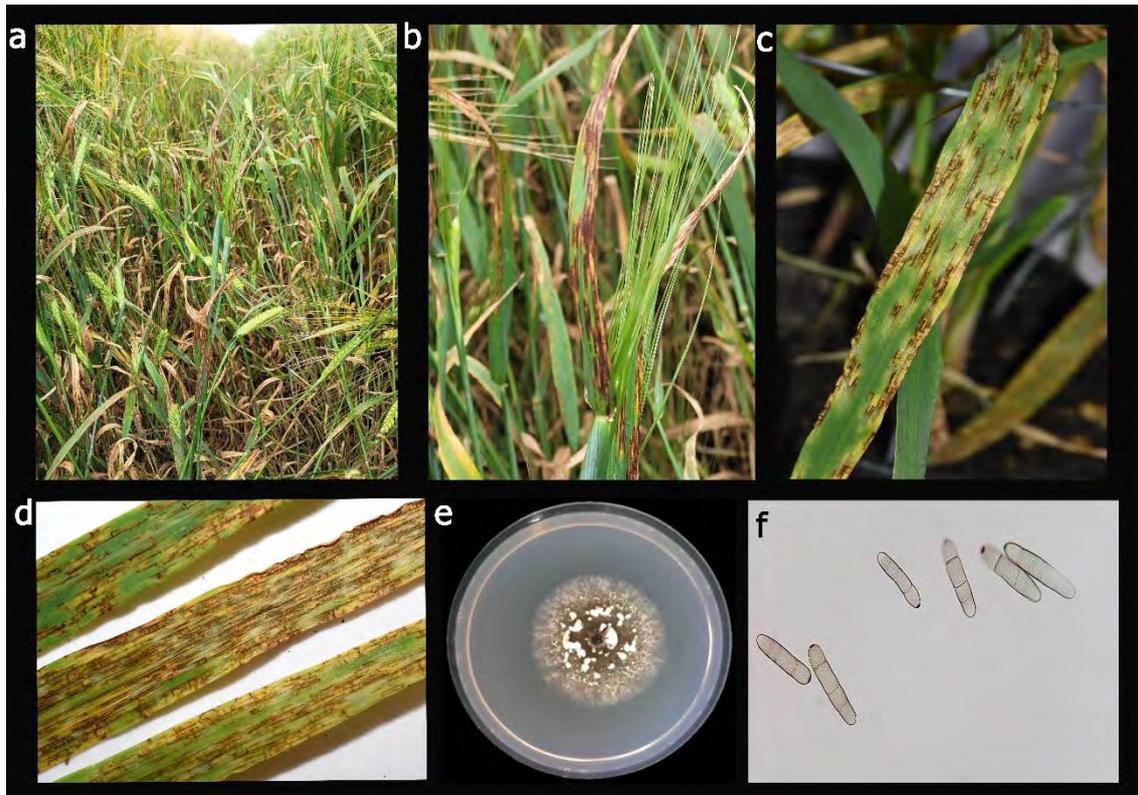


Figura 1. (a, b, c, d) Elevados niveles de intensidad de la MR de la cebada en lotes con 2 a 3 aplicaciones de fungicida durante la campaña 2021/2022 en la localidad de Balcarce; (e) Colonia de *Pyrenophora teres* mostrando columnas miceliales; (f) Conidios típicos de *P. teres*. Fotos: Carmona, M, Sautua, F y Silvana Di Núbila

Como resultado del muestreo se obtuvieron 17 aislados provenientes de las siguientes localidades de la provincia de Buenos Aires: Balcarce, Orense, Mones Cazón y campo experimental FAUBA; y Bigand de la prov. de Santa Fe.

De acuerdo a las características morfológicas y a los análisis de identidad molecular (*secuenciación en la región ITS*) se confirmó que todos los aislados corresponden a la forma *P. teres* forma *teres*.

Confirmación de Resistencia a carboxamidas

Para evaluar la sensibilidad a fungicidas y discriminar como primer paso entre cepas resistentes y sensibles, se realizó un ensayo exploratorio. Para evaluar el porcentaje de germinación, como indicador de la sensibilidad a los fungicidas evaluados, doscientos conidios de cada aislado fueron sometidos a las concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 ppm de pydiflumetofen y fluxapyroxad. El ensayo se repitió una vez (cuatrocientos conidios evaluados). Se incluyó una cepa sensible del año 2008, proveniente de San Pedro, Bs. As., que nunca fue expuesta al uso de carboxamidas en el cultivo de cebada.

Todos los conidios de la cepa sensible fueron inhibidos por ambas moléculas en un 100% a partir de 0.1 ppm, demostrando la alta fungitoxicidad de las carboxamidas antes de su

uso en Argentina. Contrariamente las cepas 11, 15 y 21 presentaron un 100% de germinación de todos los conidios incluso hasta 10 ppm de ambas carboxamidas, demostrando resistencia de laboratorio de estas cepas a ambas moléculas. Estos datos son coincidentes con la resistencia “de campo” observada durante el monitoreo de los lotes con falta de control de la MR.

El resto de los aislados mostraron un gradiente de germinación, en función de las dosis y moléculas evaluadas indicando, en algunos casos, una reducción significativa de la sensibilidad en comparación con la cepa salvaje.

Los estudios de secuenciación de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) en todos los aislados determinó una amplia variedad de mutaciones que afectaron a las subunidades B, C y D de la mencionada enzima. La cepa sensible no presentó ninguna mutación en las tres subunidades secuenciadas. Estos resultados confirman la resistencia observada a campo y en laboratorio. La resistencia se detectó en ambas moléculas carboxamidas evaluadas, a pesar del poco uso de una de ellas, indicando claramente un caso de resistencia cruzada que deberá ser analizada para futuras decisiones.

Confirmación de la resistencia a estrobilurinas

Todos los aislados evaluados fueron resistentes a las tres estrobilurinas evaluadas (azoxistrobina, trifloxistrobina y piraclostrobina), presentando elevados porcentajes de germinación de conidios a todas las concentraciones evaluadas (0.1, 1 y 10 ppm). Pyraclostrobina inhibió en promedio el 100% de la germinación a 10 ppm, a diferencia de las otras moléculas QoI. Sólo la cepa salvaje (de baja exposición a fungicidas) mostró inhibición total aun en la dosis más baja evaluada (0.1 ppm).

Los estudios moleculares no detectaron las mutaciones G143A (esta mutación nunca fue encontrada en *Pt*), ni F129L en el gen mitocondrial citocromo b (*cytb*). Se continúan los estudios en búsqueda de otras mutaciones o mecanismos de resistencia.

Confirmación de Resistencia a cyproconazole

Tres aislados fueron completamente insensibles al cyproconazole en dosis de 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 ppm, demostrando la pérdida de fungitoxicidad a este triazol. El resto de los aislados mostró un gradiente de inhibición a las dosis de cyproconazole, pero evidenciando una notoria pérdida de sensibilidad a este i.a., con EC_{50} elevadas. En contraste, la cepa salvaje fue completamente inhibida a dosis bajas de esta molécula ($EC_{50} < 1$ ppm). Los tres aislados resistentes al cyproconazole, resultaron completamente sensibles a epoxiconazole, prothioconazole y propiconazole. Por lo tanto, estos triazoles continúan siendo i.a. efectivos para el manejo de la MR. Se continúan los estudios moleculares para determinar la causa de resistencia o pérdida de sensibilidad a este grupo de fungicidas.

¿Por qué está ocurriendo la resistencia a fungicidas de cepas de *P. teres* en Argentina? ¿Qué debemos hacer? Causas y recomendaciones

1) Siembra de la misma variedad susceptible en la mayoría de la superficie de cebada

Actualmente, la variedad Andreia representa aproximadamente el 60% del área total sembrada con cebada. Este genotipo es altamente susceptible a la MR. El uso continuo de esta variedad durante años consecutivos llevó a tornar aún más susceptible a esta variedad, y aumentar considerablemente la cantidad de inóculo presente en los lotes, y el riesgo de generación de resistencia de los aislados de Pt a fungicidas.

Recomendación: se requiere contar con una oferta más variada de genotipos alternativos. La industria maltera y los semilleros deberán tener acuerdos y consensos para aceptar diferentes variedades para su siembra y posterior malteo.

2) Siembra bajo monocultivo.

Todos los agentes causales de las manchas foliares de cebada incluido *P. teres*, son capaces de sobrevivir y multiplicarse sobre los restos culturales, lo que asegura la fuente de inóculo para las epidemias futuras. Cuanto más rastrojo de cebada haya en superficie al momento de la siembra, mayor será el riesgo y la necesidad de control químico. Actualmente, numerosos lotes se siembran bajo la presencia de rastrojo de cebada infestado con el patógeno de campañas previas. Esta práctica aumenta la presión de inóculo, y con ello la frecuencia de uso de fungicidas y el consecuente riesgo de generar resistencia por parte del patógeno.

Recomendación: se requiere realizar rotación de cultivos que permita la descomposición de los restos culturales de cebada de años previos.

3) Tratamiento de semilla:

P. teres es un patógeno muy frecuente en semillas, y es transmitido con una tasa de transmisión del 21%. La diseminación a grandes distancias es por semillas infectadas. La siembra de semillas infectadas introduce la MR en campos nuevos o bajo rotación. En Argentina se realizan muy pocos análisis sanitarios de semillas previo a la siembra y la elección de fungicidas curasemillas representa actualmente una etapa crítica para la producción de cebada. En numerosos lotes se utilizan moléculas carboxamidas como fungicida en semilla por su demostrada eficiencia de control. Sin embargo, la utilización consecutiva de estas moléculas sin tener asociada en la mezcla otra molécula de diferente mecanismo de acción pero que también sea altamente eficiente para el control de *P. teres*, aumenta la presión de selección de cepas resistentes desde el inicio del cultivo. La aplicación de carboxamida en semilla, donde esta molécula es la “protagonista” del control, debe ser considerada con un máximo de dos posibles aplicaciones durante todo el ciclo del cultivo de cebada (aplicación en semilla más foliar).

Recomendación: se requiere un programa de gestión integral de producción de semilla. Jerarquizar y asumir que los agentes causales de manchas foliares son los principales patógenos objetos de control en semilla. Realizar análisis sanitario previo a la siembra.

Elegir moléculas y dosis eficientes. Se propone una táctica anti-resistencia mediante la combinación de moléculas que sean igualmente eficientes contra *P. teres*, (ejemplo fluxapyroxad más iprodione). Esto es válido tanto para las carboxamidas presentes en el mercado y las que próximamente serán lanzadas, **ya que en este trabajo se confirmó la resistencia cruzada entre las carboxamidas**

4) Diagnóstico correcto, y momento de aplicación. Umbrales de decisión (UDE)

El monitoreo y conocimiento de los UDE actualizados para la MR son imprescindibles para decidir el momento de la aplicación de fungicidas. Muchas veces la aplicación se realiza tardíamente, lo que aumenta la presión de inóculo en el lote y las fallas de control consecuentes.

Recomendación: realizar un diagnóstico correcto para descartar síntomas abióticos (ej. manchas fisiológicas). Se requiere **aplicar un fungicida solamente cuando sea necesario, de acuerdo con los UDE desarrollados y validados** en el país (incidencia foliar del 15 al 20%), desde macollaje hasta inicio de grano lechoso.

5) Dosis de fungicidas recomendadas y utilizadas

En nuestro país, existen recomendaciones por parte de algunos técnicos de realizar “división de dosis” para el control de enfermedades de la cebada. Sin embargo, es necesario tomar conciencia que la división de una determinada dosis de fungicida en dos o más aplicaciones selecciona con más fuerza cepas resistentes, en comparación con la selección ejercida por una aplicación única. Esto se debe a que, si la dosis de cada aplicación se reduce a la mitad o se divide, el periodo de tiempo durante el cual la selección se lleva a cabo se duplica. Sin lugar a duda, esta recomendación debe haber sido uno de factores más influyentes para la generación de cepas resistentes a carboxamidas en Argentina.

Recomendación: se requiere **respetar las dosis de marbete** y obedecer las restricciones indicadas en los mismos. Este es otro componente importante de la gestión de resistencia a los fungicidas. **No dividir las dosis en dos o más aplicaciones.**

6) Uso de azoles en Argentina

Desde los comienzos de uso de fungicidas en cebada, el triazol cyproconazole fue frecuentemente utilizado en Argentina en mezcla con azoxistrobina. Por todo esto, podemos especular que el uso continuado de ciproconazol haya seleccionado algunas cepas resistentes de *Pt* a este ingrediente activo. En contraste, los triazoles epoxiconazole, prothioconazole y propiconazole mantienen alta fungitoxicidad (eficiencia de control) a todos los aislados aquí estudiados. Este resultado es similar al obtenido para el agente causal de la mancha amarilla (*Ptr*)

Recomendación: Utilice triazoles efectivos a las dosis recomendadas. Verifique la dosis de campo efectiva. Utilice en mezclas con otros fungicidas de diferente mecanismo de acción

7) Uso de carboxamidas en el cultivo de cebada

La aparición de nuevas moléculas carboxamidas han demostrado generar un mejor y eficiente control de manchas foliares en la cebada. Desde la aparición de la epidemia de *Rcc* en 2012, las carboxamidas conquistaron rápida y ampliamente el mercado de cebada por su eficiencia de control sobre este patógeno. Actualmente, estas moléculas vienen formuladas en diferentes mezclas conteniendo azoles y/o estrobilurinas. Todos los años y desde 2012/2014, prácticamente todos los lotes de cebada reciben entre 1 a 3 aplicaciones de carboxamidas. Como fuera dicho anteriormente, el tratamiento de semillas también se realiza frecuentemente con carboxamidas.

La división de dosis de fungicidas conteniendo carboxamidas y las aplicaciones consecutivas de estas moléculas en el mismo lote vía semilla y foliar generaron una selección direccional, provocando la aparición de cepas resistentes. No hay que olvidar que la aplicación repetida de productos químicos con el mismo modo o mecanismo de acción es una de las principales razones de la generación y evolución de la resistencia a fungicidas.

Recomendación: en Argentina es necesario respetar el máximo número de aplicaciones de carboxamidas por campaña recomendado por la FRAC. Este máximo es de dos aplicaciones por año, considerando al tratamiento de semillas como si fuera una aplicación de ese máximo. Asociar las carboxamidas con otras moléculas de diferente mecanismo de acción pero similarmente eficientes para controlar *P. teres* en semilla. Acompañar a los fungicidas foliares conteniendo carboxamidas con azoles efectivos, como por ejemplo epoxiconazole, prothioconazole y propiconazole, y con alternativas químicas (ej. fungicidas multisitio, inductores de la resistencia, fosfitos, moléculas bio-racionales, etc). **No dividir una misma dosis recomendada en dos aplicaciones y recuerde que existe resistencia cruzada entre carboxamidas.**