

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO Y DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN *PODOSPHAERA* *XANTHII*.

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA CELULAR Y
MOLECULAR



Universidad de Málaga
Facultad de Ciencias

ALEJANDRA VIELBA FERNÁNDEZ

Dirigida por:
Dr. Alejandro Pérez García
Dra. Dolores Fernández Ortuño

Málaga, julio 2022



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Alejandra Vielba Fernández

 <https://orcid.org/0000-0003-1412-4031>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña ALEJANDRA VIELBA FERNANDEZ

Estudiante del programa de doctorado BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTUDIO Y DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN PODOSPHEA XANTHII

Realizada bajo la tutorización de ALEJANDRO PÉREZ GARCÍA y dirección de ALEJANDRO PÉREZ GARCÍA Y DOLORES FERNÁNDEZ ORTUÑO (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 18 de MAYO de 2022

Fdo.: ALEJANDRA VIELBA FERNÁNDEZ
Doctorando/a

Fdo.: ALEJANDRO PÉREZ GARCÍA
Tutor/a

--



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

El Dr. ALEJANDRO PÉREZ GARCÍA, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, y la Dra. DOLORES FERNÁNDEZ ORTUÑO, Investigadora de la Universidad de Málaga, CERTIFICAN:

Que Dña. ALEJANDRA VIELBA FERNÁNDEZ ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, el trabajo de investigación recogido en esta memoria de tesis doctoral, con el título original “ESTUDIO Y DESARROLLO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN *PODOSPHAERA XANTHII*”.

Tras la revisión de la presente memoria, se ha estimado oportuna su presentación ante la Comisión de Evaluación correspondiente, por lo que autorizamos su exposición y defensa para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga a 28 de abril de 2022.

DR. ALEJANDRO PÉREZ GARCÍA

DRA. DOLORES FERNÁNDEZ ORTUÑO

--	--

ESTE TRABAJO HA SIDO SUBVENCIONADO POR:

Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad (FPU17/00583).

Proyecto MINECO (AGL2016-76216-C2-1-R) titulado “Desarrollo de nuevas herramientas para el control de oídios”.

ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL:

1. Vielba-Fernández, A., Bellón-Gómez, D., Torés, J. A., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2018). Heteroplasmy for the cytochrome *b* gene in *Podosphaera xanthii* and its role in resistance to QoI fungicides in Spain. *Plant Disease*, 102(8), 1599-1605. (Q1 - Factor de Impacto 3.583).
2. Vielba-Fernández, A., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2019). Monitoring Methyl Benzimidazole Carbamate-resistant isolates of the cucurbit powdery mildew pathogen, *Podosphaera xanthii*, using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease*, 103(7), 1515-1524. (Q1 - Factor de Impacto 3.809).
3. Vielba-Fernández, A., Polonio, Á., Ruiz-Jiménez, L., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2020). Fungicide resistance in powdery mildew fungi. *Microorganisms*, 8(9), 1431. (Q2 - Factor de Impacto 4.128).
4. Vielba-Fernández, A., Polonio, Á., Ruiz-Jiménez, L., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2021). Resistance to the SDHI fungicides boscalid and fluopyram in *Podosphaera xanthii* populations from commercial cucurbit fields in Spain. *Journal of Fungi*, 7(9), 733. (Q1 - Factor de Impacto 5.816).

Agradecimientos

Después de estar más tiempo del que me gustaría admitir delante del Word, definitivamente esto está siendo la parte más complicada de escribir. Y, en el fondo, tengo claro que es por este párrafo en concreto. Esta tesis va dedicada a ti, Juan Antonio, porque ojalá estuvieras entre el público dentro de unos meses. Aún tengo en la memoria el momento exacto en el que leí el mensaje de Lola, y la sensación de que tenía que ser una mentira. Que te iba a volver a ver por el pasillo con el bastón, que ibas a venir a advertirme del peligro de trabajar con el fuego o que iba a poder preguntarte cualquier duda que tuviera. Siempre te voy a estar agradecida por todo lo que hiciste por mí, por hacerme sentir tan arropada nada más empezar, y por todo lo que me enseñaste. Y, tal y como me dijiste en el 2017, ahí está la foto de microscopía que podría ser la portada de mi tesis. Ojalá hubiera podido correr a enseñártela en persona.

Esta tesis doctoral no habría sido posible de no ser por mi Director y Tutor, Alejandro. Muchas gracias por todos tus consejos e ideas, por guiarme cuando estaba atascada en algún ensayo, y por toda la ayuda que me has prestado. Este trabajo también es tuyo. También tengo que agradecer todo su apoyo al resto de jefes de este grupo: a Antonio, por todos sus consejos y correcciones, y por soportar tener otra miniLola dando vueltas; a Francis, por tu amabilidad y cercanía, ¡y por enseñarme a Junji Ito!; a Cayo, por toda la ayuda que nos has prestado, por estar siempre ahí para dar un buen consejo; a Diego, por ser un ejemplo de un buen investigador y transmitírnoslo a todos. Gracias a todos por haberme ayudado a ser la científica que soy hoy en día.

Y, por supuesto, a Lola. Gracias por haber puesto ese cartel en la torre buscando a alguien para trabajar contigo, y gracias por elegirme de entre todos los candidatos. Me has dado la oportunidad de demostrar a los demás, y sobre todo a mí misma, mi valía, y he podido aprender que “para brillar no hace falta apagar la luz de los demás”. Más que una directora de tesis, has sido una amiga. Has estado ahí para aconsejarme, para darme un toque de atención cuando lo necesitara, para escucharme tanto cabreada como llorando, para poder compartir algún cotilleo, para todo. Me dijiste que querías llegar a ser una jefa como Guido, y yo te puedo responder que para mí has sido la mejor directora de tesis que podría haber deseado. Gracias por todos estos años.

Estos cuatro años no han transcurrido el mismo lugar, sino que donde empecé a dar mis primeros pasos en el manejo del oídio fue en La Mayora. Allí he compartido muy buenos momentos con todos mis compañeros de los distintos departamentos, y recuerdo con muchísimo cariño todo el tiempo que pasé en la pequeña familia que se forma en esa finca.

Me gustaría agradecer a mis compañeras de despacho Librada, Isa y Gloria por toda su ayuda y su amabilidad, a los técnicos del laboratorio de Micología, Pulido y posteriormente Estrella, por todo ese tiempo que me ahorraron y todo lo que me enseñaron (aún tengo la pinza de Pulido, y todo el mundo sabe que es mi tesoro), a mis compañeros tanto de residencia como de laboratorio Rida, Irene, Lidia, David, Diego y Efrén. Compartir todas esas horas que echábamos con vosotros, que siempre teníais una sonrisa y tiempo para escuchar, ha sido un placer. Y en especial me gustaría agradecer a las AliOliEliAle, que hicieron que cada vez que pienso en Torre del Mar y en La Mayora sólo pueda tener una sonrisa. A Olaya, por conseguir sacarme una carcajada con cualquier comentario. Estoy super contenta por el puesto que tienes ahora y la nueva vida que has empezado, y seguro que allá donde estés le alegras el día a todos. A Alicia, porque siempre he admirado tu amabilidad y la fortaleza que tienes en el trabajo (y porque eres la única persona que ha conseguido que quiera salir a correr). Vas a arrasas en tu postdoc y en todo lo que te propongas. Y en especial a Elisa. Porque si todos fueran como tú, el mundo sería un lugar mejor. El haberte conocido es el mayor tesoro que me he llevado de la Mayora. Muchas gracias por todo esos días juntas como vecinas de la residencia, y por todas esas llamadas para ponernos al día y que “tenemos que hacer más a menudo”. Ser tu amiga es una de las cosas de las que me siento más orgullosa.

Aunque al principio fue un drama en mi vida, el cambio de La Mayora a la Torre (y ahora el IHSM) me hizo conocer a muchas personas increíbles. Me gustaría mencionar el grupo de Cayo, tanto a los nuevos jefes, Luis, como los que ya han pasado a una nueva etapa, Adrián y a Alba, como a los que se encuentran con nosotros ahora mismo, Carla, Hilario y Antonio. Teneros como compañeros es una cosa que no puedes dejar de agradecer. También el grupo de Diego, que ahora que estamos en el mismo edificio he podido descubrir lo geniales que sois todos. A mis compañeros de despacho Alicia, Laura, Jesús y Ana, porque hacéis más llevadera todas esas horas en el ordenador, y a el resto del equipo, Carlos, Luis, María, David, Saray y Montse. Sin duda el teneros cerca ha sido una de las mayores ventajas de la mudanza. Y, finalmente, los de “ciencias”, el grupo de Cazorla: Eva, Guti, Carmen, Zahira, Sandra (GRACIAS por todo lo que me has ayudado con la tesis y por ser un vórtice de alegría allá donde vas), a las nuevas integrantes, Lucía y Blanca, y a Rafa, que sabes que eres una chica más del grupo del B105, y siempre estaremos ahí para entretenerte en tus minutos de descanso. Sois un grupo increíble y es un placer ir a Ciencias, no por el lugar sino por el grupazo que se ha montado. Vais a arrasas en el mundo de la ciencia.

Y llega el momento de la Torre, con todas esas personas maravillosas que he conocido allí (y casualmente – o no – la mayoría ya no seguimos en ese edificio). A Jesús, por ser un punto

de apoyo tan importante y soportar todas mis preguntas al comenzar. A Mariqui, por todas esas conversaciones a la hora de comer y todos esos consejos del amplio mundo de la micología. A Irene, que has sido mi compañera de estilo de vida, sintiéndome comprendida en todas las etapas por las que he pasado. El poder comentarte la comida, los productos químicos, los sitios para comer, las ONG, es algo que recuerdo con mucho cariño. Se te echa muchísimo de menos, aunque en el fondo te seguimos viendo todas las mañanas. A Alvarito, por todas esas horas hablando de cualquier cosa por tal de procrastinar, por estar siempre dispuesto a dejar lo que estés haciendo por ayudarnos. Me alegro muchísimo de tu nueva vida, te lo merecías. A Cañas, por haberme tratado con esa aceptación y ayudarme en todas las dudas que he tenido, a pesar de todo. Es un orgullo que seas el Director de Josemi. A Paco, por hacerme sentir arropada en ese momento tan extraño, y por tu amabilidad y cariño. Espero que te vaya genial en tu nueva empresa. A Belén y Fernando, por ayudarme en todas las dudas que me surgían de repente, haciendo que diera un viaje rápido a “bioquímica” a resolverlo. A Alberto, porque ¿qué te voy a decir que no sepas después de tanto tiempo? Pienso seguir asustándote y dejándote notas y dibujos, no sé cómo, pero lo haré. Muchas gracias por todo, de verdad. Eres una persona increíble. Me alegro mucho de que hayamos compartido todo este tiempo juntos, y no te vas a librar de mí, aunque lo intentes, porque más que un amigo eres un tesoro.

Mis chicas del IHSM tienen que estar flipando con la cantidad de cursiladas que estoy escribiendo. Y sí, hay para vosotras también. A Laura, que ha estado currándose la tesis a mi lado durante todos estos años. Muchas gracias por toda tu ayuda. Sigo admirando con que seas capaz de recordar todo y ser tan organizada. La próxima tesis es la tuya y la vas a bordar, ¡ya verás! A Nisrine, que, aunque lleva “poco tiempo” con nosotras, ya se ha hecho un huequecito en nuestros corazones. Muchísimas gracias por todas esas conversaciones y por reírte de mi acento cuando digo palabras árabes. Sabes que jamás lo voy a pronunciar bien, es superior a mí. A Isa, por ser mi Minion. El poder llegar al laboratorio, soltar cualquier chorrada y que te sigan el rollo, eso no tiene precio. Haces que el ir cada día a trabajar sea menos duro, por muy complicada que esté la cosa. A Yandira, el ejemplo del trabajo duro. Si se te confía cualquier cosa, la vas a sacar adelante. Eres el mejor fichaje que pudo hacer Lola, y siempre te voy a estar agradecida por toda la ayuda que me has prestado, QUE ES UN MONTÓN. Muchas gracias por ser cómo eres. A Virgi, una de las personas que más admiro. Ojalá pudiera ser una milésima parte de lo increíble que eres. No te haces una idea de lo que aprecio tu amistad y de lo feliz que soy de que entrases al laboratorio. Y a Alba, que ya desde el TFG sabía que te teníamos que “fichar”, que eras la mejor elección que ha podido hacer Lola. Este año que hemos estado como compañeras no ha hecho nada más que confirmar lo

que pensaba de ti, que eres una pedazo de científica. Y, además, una pedazo de amiga. Voy a echar muchísimo de menos trabajar contigo.

Aunque en las Tesis Doctorales se refleja el trabajo duro realizado en el laboratorio y en el despacho, este camino no se ha recorrido solo. Muchas personas, como todas las que he nombrado anteriormente, han colaborado directamente; pero hay otras que han apoyado de distinta manera, ayudándote a despejarte, a recargar pilas en el fin de semana. Es por eso por lo que también tengo que agradecer a mis amigos. Por ayudarme a empezar con ganas la semana, por seguir ahí cuando he necesitado desaparecer, por hacerme pensar en otra cosa cuando no podía más. Gracias a Talia, Lautaro, Mérida, Jose, Lucía, Alfonso, Antonio, Lucas, Irene, Alejandro, a mi grupo de 9GAG Aitor, Miguel, Jon, Paula, Agus. Esta tesis también es vuestra.

Y, por supuesto, tengo que agradecer a mi familia el que esté aquí escribiendo este texto. Por todo ese apoyo que me dan siempre, por saber que van a estar ahí empujándome para que siga adelante y consolándome si me tropiezo. A mis padres, Mar y Paco, por haber soportado mis momentos de estrés y haberme escuchado desahogarme mil y una veces. A mis tíos, Pepa y Carlos, por hacerme sentir que tengo otros padres a unas casas de mí, por ese amor infinito que sois capaces de dar. Y a mi hermana, Eva, la persona más buena que he conocido. Gracias por ser como eres, gracias por estar siempre allí. Esto no habría sido posible sin vosotros.

Y, para terminar, gracias a ti. Gracias por todo lo que hemos vivido, que nos ha hecho madurar y mejorar como personas. Gracias por ser el mayor apoyo que he tenido. Gracias por ser mi pareja, mi mejor amigo, la persona con la que más compenetro. Hemos pasado por mucho, pero aquí estamos. Tú, yo y los tequeños. Siempre juntos allá donde nos depare el destino, pero como un equipo. Te amo muchísimo, Josemi. Eres lo mejor que me ha pasado.

Muchas gracias por toda vuestra ayuda. Esta tesis es de todos.

ADIOS, HERMOSOS Y HERMOSAS.

A mi familia

A Juan Antonio Torés

Índice

I.	Resumen.....	1
II.	Introducción	9
III.	Objetivos	55
IV.	Resultados	58
	1. Fungicide resistance in powdery mildew fungi.....	59
	2. Resistance to the SDHI fungicides boscalid and fluopyram in <i>Podosphaera xanthii</i> populations from commercial cucurbit fields in Spain.	110
	3. Heteroplasmy for the cytochrome <i>b</i> gene in <i>Podosphaera xanthii</i> and its role in resistance to QoI fungicides in Spain.	150
	4. Monitoring Methyl Benzimidazole Carbamate-resistant isolates of the cucurbit powdery mildew pathogen, <i>Podosphaera xanthii</i> , using Loop-Mediated Isothermal Amplification.	171
V.	Discusión general.....	196
VI.	Conclusiones.....	224

Índice de figuras

II. INTRODUCCIÓN

Figura II.1. Ciclo de vida de los oídios.....	11
Figura II.2. Sintomatología de las diferentes especies de oídio	12
Figura II.3. Diferentes métodos de control empleados para el control de los oídios.....	15
Figura II.4. Esquema de los diferentes tipos de fungicidas, agrupados según su modo de acción, tipo de movilidad y el tipo de protección	19
Figura II.5. Representación de una matriz del riesgo de desarrollo de resistencia.....	23
Figura II.6. Mecanismos de acción de los fungicidas DMI, fungicidas SDHI, fungicidas QoI y fungicidas MBC	29
Figura II.7. Estrategias de monitorización de resistencias a fungicidas.....	35

IV. RESULTADOS.

Artículo 1. Fungicide resistance in powdery mildew fungi.

Figure 1. Typical powdery mildew symptoms observed on leaves and fruits of several crops	60
Figure 2. Typical life cycle of powdery mildew fungi	61
Figure 3. Biochemical mode of action of the main classes of fungicides with resistance described in powdery mildew fungi	71

Artículo 2. Resistance to the SDHI fungicides boscalid and fluopyram in Podosphaera xanthii populations from commercial cucurbit fields in Spain.

Figure 1. Percentage and phenotype of SDHI isolates detected in the SDHI field monitoring studies	125
Figure 2. Percentage of ungerminated conidia, conidia with germ tube and conidia with two or more germ tubes incubated at 17 °C and 23 °C for 24, 48 and 72 h	133
Figure 3. Percentage of fungal colony growth, starting from a single spore and covering the surface of a zucchini cotyledon.....	133

Artículo 3. Heteroplasmy for the cytochrome b gene in Podosphaera xanthii and its role in resistance to QoI fungicides in Spain

Figure 1. ARMS PCR of the cytb G143A alleles for <i>Podosphaera xanthii</i> clones 10, 4, and 5 (G143 QoI-sensitive allele) of the isolates UMAF2240 and UMAF22770; and clones 10, 5, 7, and 8 (A143 QoI-resistant allele) of the isolates UMAF22770 and UMAF24732	160
Figure 2. Frequencies of sensitive G143 and resistant A143 cytb alleles in QoI-sensitive and QoI-resistant isolates of <i>Podosphaera xanthii</i>	160

Artículo 4. Monitoring Methyl Benzimidazole Carbamate-resistant isolates of the cucurbit powdery mildew pathogen, Podosphaera xanthii, using Loop-Mediated Isothermal Amplification.

Figure 1. Schematic representation of LAMP primers in β -tubulin gene to detect E198A mutant genotype in <i>P. xanthii</i>	175
Figure 2. Specificity of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) using different primer sets.....	184
Figure 3. Optimization of reaction conditions for primer set 2.....	186
Figure 4. Sensitivity of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) versus polymerase chain reaction (PCR) for the detection of the E198A mutation using 10-fold serially diluted genomic DNA extracted with the MasterPure Yeast DNA Purification Kit	188
Figure 5. Sensitivity of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) versus polymerase chain reaction (PCR) for the detection of the E198A amino acid change using 10-fold serially diluted genomic DNA obtained by heating.....	189

V. DISCUSIÓN

Figura V.1. Representación esquemática del porcentaje de trabajos publicados sobre resistencia a fungicidas en oídios, según la familia de fungicidas investigada o el patógeno de estudio.....	199
Figura V.2. Estructura de los fungicidas SDHI boscalida y fluopiram y representación de su sitio de unión	203
Figura V.3. Esquema de las aproximaciones usadas para el diagnóstico y la cuantificación de la resistencia a fungicidas en <i>P. xanthii</i> empleadas en esta tesis doctoral.....	209
Figura V.4. Esquema simplificado de las estrategias que integran el Manejo Integrado de Plagas (IPM)	211

Índice de tablas

Artículo 1. Fungicide resistance in powdery mildew fungi.

Table 1. Chemical classes of organic fungicides currently registered to control powdery mildew diseases	65
Table 2. Occurrence of field fungicide resistance in powdery mildews	73
Table 3. Amino acid changes in target proteins and other molecular mechanisms related with fungicide resistance to MBC fungicides, QoIs, DMIs and SDHIs in powdery mildews..	85

Artículo 2. Resistance to the SDHI fungicides boscalid and fluopyram in Podosphaera xanthii populations from commercial cucurbit fields in Spain.

Table 1. Sensitivity of 26 randomly chosen <i>Podosphaera xanthii</i> isolates to the SDHI fungicides boscalid and fluopyram.....	114
Table 2. Primers used in this study	117
Table 3. Number and frequencies of boscalid-sensitive and -resistant <i>P. xanthii</i> isolates collected from four different cucurbit production areas in Spain during 2018 and 2019 growing seasons.....	126
Table 4. Number and frequencies of fluopyram-sensitive and -resistant <i>P. xanthii</i> isolates collected from four different cucurbit production areas in Spain during 2018 and 2019 growing seasons.....	127
Table 5. Fluopyram and boscalid MIC values, phenotype, and amino acid substitution in the SdhC subunit in <i>P. xanthii</i> isolates collected during the 2018 and 2019 cucurbit growing seasons in Spain	129
Table 6. Tests and results of LAMP assay for detecting the amino acid changes A86V and G151R in <i>P. xanthii</i>	135

Artículo 3. Heteroplasmy for the cytochrome b gene in Podosphaera xanthii and its role in resistance to QoI fungicides in Spain

Table 1. <i>In vitro</i> QoI sensitivity, origin, effective inhibitory concentrations (EC50; µg/ml) to the QoI fungicide kresoxim-methyl, and molecular detection of the G143A mutation in <i>Podosphaera xanthii</i> isolates.....	154
Table 2. Analysis of cytb heteroplasmy in QoI-sensitive and -resistant <i>Podosphaera xanthii</i> isolates by ligating PCR fragments into cloning plasmids	158

Artículo 4. Monitoring Methyl Benzimidazole Carbamate-resistant isolates of the cucurbit powdery mildew pathogen, Podosphaera xanthii, using Loop-Mediated Isothermal Amplification.

Table 1. Sequence and description of the primers used in this study	176
Table 2. Fungal isolates used for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) specificity	177
Table 3. Sensitive phenotype, positive and negative LAMP results, and presence or absence of the point mutation E198A in the β -tubulin gene of <i>P. xanthii</i> isolates collected from different countries.....	180
Table 4. Field samples tested with a discriminatory dose leaf-disc bioassay and LAMP for monitoring MBC resistance	182

I. Resumen

Los oídios (*Erysiphales*) son hongos biotrofos estrictos que provocan las enfermedades más extendidas en plantas designadas con el mismo nombre, los oídios, afectando a más de 10.000 especies de angiospermas (Hirose et al. 2005). Su sintomatología es una de las más fácilmente reconocible, comenzando con la formación de manchas blancas de aspecto polvoriento en la superficie, pudiendo llegar a cubrir la mayoría de la superficie vegetal y afectando a la capacidad fotosintética de la planta (Averre y Wehnet, 1996). Existen diversos métodos de control de estas enfermedades, como son las prácticas culturales, el control químico, el empleo de cultivares resistentes o el control biológico. Las prácticas culturales se basan en todas aquellas acciones que puede realizar el agricultor para evitar el contacto entre el patógeno y el huésped, como son la rotación de cultivos, el saneamiento, el control de las condiciones del suelo, la densidad de los cultivos, etc. (Ridout, 2009). El control químico protege a la planta antes de la infección, o la cura si ya ha ocurrido, mediante el empleo de distintos compuestos que pueden tanto eliminar al patógeno como activar las defensas propias de la planta (Pérez-García et al. 2006). El empleo de cultivares resistentes se basa en el uso de diversos cultivares optimizados para evitar el desarrollo del patógeno (McCreight, 2006). Por último, los métodos biológicos emplean organismos antagonistas o agentes de control biológico capaces de reducir la cantidad del inóculo del patógeno (Sarhan et al. 2020). Aunque hoy en día el método de control más extendido para controlar a los oídios es a través del empleo de fungicidas, varias de las principales especies (*Blumeria graminis*, *Erysiphe necator* y *Podosphaera xanthii*, entre otras) han sido catalogadas por el *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC) como especies de alto riesgo de desarrollo de resistencia a fungicidas (FRAC, 2020). Para conocer más sobre esta problemática, en esta tesis doctoral se presenta una revisión actualizada analizando todos los estudios de resistencia a fungicidas documentados para los oídios en general a nivel mundial, incluyendo los mecanismos moleculares implicados, si hubieran sido identificados.

En este trabajo observamos que las especies de oídio que han desarrollado resistencia a un mayor número de familias de fungicidas son las más importantes a nivel agronómico: *B. graminis* f. sp. *tritici* (patógeno del trigo), *B. graminis* f. sp. *hordei* (cebada), *E. necator* (vid) y *P. xanthii* (cucurbitáceas); aunque también se encontraron trabajos de resistencia en otras especies, como son *Golovinomyces cichoracearum*, *Sphaerotheca pannosa*, *Erysiphe betae*, *Leveillula taurica*, y *P. leucotricha*. En general, los mayores casos de resistencia a fungicidas, tanto en oídios como en otros hongos patógenos de plantas, se han registrado frente a las

dos familias de fungicidas más comercializadas: los inhibidores de la quinona externa (QoI) y los inhibidores de la demetilación (DMI). Sin embargo, también se han publicado trabajos en relación con otras 6 familias químicas: aril-fenil-cetonas, aza-naftalenos, hidroxí-(2-amino) pirimidinas, metil benzimidazol carbamatos (MBC), inhibidores de succinato deshidrogenasa (SDHI) y dos materias activas cuyo modo de acción es desconocido, ciflufenamida y flutianilo. A pesar de que son numerosos los estudios que registran casos de resistencia tanto en el laboratorio como en el campo, el número de trabajos relacionados con el mecanismo molecular implicado en la misma es notablemente menor. Dentro de estos, la gran mayoría de los trabajos están enfocados en elucidar el mecanismo molecular de resistencia a los fungicidas QoI, estando implicado el cambio aminoacídico G143A y, en algunos casos, fenómenos de heteroplasma. También son muy numerosos los trabajos sobre los mecanismos de resistencia a los fungicidas DMI, donde se han detectado 3 cambios aminoacídicos relacionados con el fenotipo resistente y una mutación puntual que incrementaba la expresión del gen diana de este grupo de fungicidas, el gen *cyp51*. Con respecto a los fungicidas MBC y SDHI, familias cuyo mecanismo de resistencia molecular también ha sido descrito, sólo se han publicado trabajos en *P. xanthii*, describiendo el cambio E198A en β -tubulina para los fungicidas MBC, y 5 cambios aminoacídicos diferentes para los fungicidas SDHI en dos de las tres subunidades de succinato deshidrogenasa que forman el bolsillo de unión del fungicida. Para el resto de las familias, el mecanismo molecular de resistencia no está del todo claro. Centrándonos en las especies nombradas en esta revisión, el oídio de las cucurbitáceas es la especie que más publicaciones relacionadas con la disminución de sensibilidad tiene registrados, siendo incluso a todas las familias de fungicidas descritas en esta revisión. Este dato es de especial importancia, puesto que Andalucía es una de las principales productoras nacionales de hortalizas, representando la familia de las cucurbitáceas el 23.1% de este total (Informe Anual del Sector Agrario en Andalucía, 2020). Dentro de las más de 200 enfermedades que pueden atacar a estos cultivos, el oídio, causado por *P. xanthii*, es una de las más importantes tanto en invernadero como en cultivos al aire libre (Seebold, 2010; Informe Anual de la Junta de Andalucía, 2022; Fernández-Ortuño et al. 2006; López-Ruiz et al. 2010; Bellón-Gómez et al. 2015).

En trabajos realizados anteriormente en nuestro país, se describieron altos niveles de resistencia de *P. xanthii* a diferentes familias de fungicidas, como los fungicidas QoI (Fernández-Ortuño et al. 2006), los fungicidas MBC (Bellón-Gómez et al. 2015) y los fungicidas DMI (López-Ruiz et al. 2010). Sin embargo, no existían datos de resistencia a una de las últimas familias registradas y comercializadas para el control del oídio de las cucurbitáceas, los fungicidas SDHI. Es por ello que otro de los objetivos de esta tesis doctoral

fue conocer la presencia/ausencia y niveles de resistencia para esta familia. En un primer momento se analizó la sensibilidad basal de 26 cepas de *P. xanthii*, aisladas durante los años 1996-2016, realizando para ello un ensayo de discos con concentraciones crecientes, desde 0.01 a 10 mg/L, de dos fungicidas SDHI, boscalida y fluopiram. Los 26 aislados se agruparon en tres categorías diferentes de acuerdo con su sensibilidad: aislados con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) igual a 1 mg/L, con una CMI < 10 mg/L y con una CMI = 10 mg/L. Basándonos en estos datos, se estableció 10 mg/L como dosis discriminatoria para diferenciar aislados sensibles de resistentes, aunque también se incluyeron tres concentraciones superiores (25, 50 y la dosis de campo de 100 mg/L) para poder detectar aislados con diferentes niveles de resistencia. Con estas concentraciones se realizó un estudio de monitorización para ambos compuestos durante las campañas de 2018-2019, recogiendo y analizándose un total de 296 aislados tomados desde las principales regiones productoras de cucurbitáceas del sur de España: Almería, Granada, Málaga y Murcia. Este estudio consistió en un ensayo de discos con las concentraciones anteriormente mencionadas, clasificándose los aislados de acuerdo con su capacidad de crecer en cada una de ellas: baja resistencia [low resistance (LR); 25 mg/L], media resistencia (MR; 50 mg/L), resistencia (R; 100 mg/L con crecimiento normal) y alta resistencia [high resistance (HR=; 100 mg/L con crecimiento vigoroso)]. Para boscalida, se detectaron 185 aislados sensibles (96 en 2018 y 89 en 2019; 62,1%) y 113 aislados con diferentes fenotipos de resistencia (40 LR, 13,4%; 36 MR, 12,1% y 37 R, 12,4%). Las provincias de Málaga y Granada fueron las que presentaron los menores porcentajes de resistencia a boscalida (0 y 0,7%, respectivamente), mientras que las provincias de Murcia (con un LR global del 1,7%, 6,4% MR y 7,4% R) y Almería (11,7% LR, 5,7% MR y 4,4% R) tuvieron la mayor frecuencia de resistencia. Para fluopiram, se describieron 167 aislados sensibles (95 en 2018 y 72 en 2019; 56%), mientras que 131 tenían algún nivel de resistencia (1% LR, 3% MR, 22,5% R y 17,4% HR). Los resultados por provincias fueron similares a los obtenidos para boscalida, con frecuencias más bajas de resistencia en Málaga y Granada (0 y 0,7%) y las más altas en Almería, seguida de Murcia (24,5 y 18,8%, respectivamente). Sin embargo, cuando se realizó un ensayo *in planta* con aislados representativos de cada uno de los fenotipos observados en los ensayos de discos, sobre plantas de melón tratadas con la dosis recomendada en campo de 100 mg/L para boscalida y fluopiram, todos fueron capaces de crecer vigorosamente a esta concentración. Aunque esta diferencia podría estar basada en la naturaleza de los ensayos, donde las plantas empleadas en el ensayo *in planta* podrían estar incorporando una concentración menor de fungicida en comparación con los discos de cotiledón, estos resultados llevaron a cuestionarnos qué mecanismo molecular podría estar implicado en esta resistencia. Para

esclarecerlo, se amplificaron y secuenciaron las subunidades B, C y D, implicadas en el bolsillo de unión de los fungicidas SDHI, en 9 aislados sensibles y 66 aislados resistentes con diferentes fenotipos de resistencia *in vitro*. Tras el análisis de secuencias, se observaron dos mutaciones puntuales, una que resultaba en el cambio aminoacídico A86V, presente en todos los aislados resistentes, independientemente del fungicida o del fenotipo, y otra en el cambio G151R, observado únicamente en dos aislados resistentes a boscalida y sensibles o poco resistentes a fluopiram. Por otro lado, se analizó la posible penalización para la supervivencia que estas dos mutaciones podrían estar provocando en estos aislados y, para ello, se llevaron a cabo ensayos de germinación de conidios y desarrollo micelial. Los datos obtenidos, mostraron que no existía ninguna diferencia significativa entre los aislados sensibles y resistentes a los fungicidas SDHI.

Por otra parte, en esta tesis doctoral también nos planteamos esclarecer el mecanismo de resistencia a otra importante familia de fungicidas inhibidores de la respiración mitocondrial, los QoI, aún desconocido de acuerdo con un estudio anterior (Fernández-Ortuño et al., 2006). En este trabajo no se había observado la principal mutación responsable de la resistencia a los fungicidas QoI, el cambio aminoacídico G143A, en los aislados resistentes analizados. Por ello, fue planteada la hipótesis de que la proteína de Rieske, la cual, junto con la proteína citocromo b forma parte del bolsillo de unión de estos fungicidas, pudiera tener alguna relación con la resistencia. Para confirmarla, se amplificó y secuenció el gen *risp* en 6 aislados de *P. xanthii*, 3 sensibles y 3 resistentes, no encontrándose ninguna diferencia entre ambos fenotipos. A partir de aquí, nos planteamos si la heteroplasma mitocondrial (presencia simultánea de alelos diferentes de un gen mitocondrial en una misma célula) era responsable de la resistencia a los fungicidas QoI. Este fenómeno ya se había observado en otros hongos fitopatógenos, como *Venturia inaequalis*, donde una frecuencia de más del 62% de los alelos resistentes (A143) otorgaba ese fenotipo (Villani y Cox, 2014). Para corroborar esta hipótesis, se seleccionaron 22 aislados de *P. xanthii*, 10 sensibles y 12 resistentes, y se clonó el gen *cytb* en cada uno de ellos, seleccionándose 10 colonias de cada construcción y secuenciándose. En los resultados obtenidos se pudo observar la presencia de construcciones con el alelo *cytb* sensible, sin el cambio G143A, y construcciones con el alelo resistente portadores de la mutación A143, para el mismo aislado. La frecuencia de los alelos mutados incluía desde el 10% al 60% en los aislados sensibles, y del 70 al 100% en los aislados resistentes, confirmándose la heteroplasma como mecanismo molecular de resistencia a los fungicidas QoI. Sin embargo, y para poder analizar de una manera más rápida el porcentaje de estos alelos, se desarrolló una técnica de PCR específica de alelo junto con una PCR cuantitativa, denominada ARMS-

qPCR de sus siglas en inglés *Amplification-Refractory Mutation System*. Para ello, se diseñaron cebadores específicos para amplificar por separado el alelo sensible y el alelo resistente. La capacidad de cuantificación se comprobó en una qPCR usando como molde diferentes proporciones de las construcciones portadoras de los alelos sensibles y resistentes, comprobado que los datos empíricos coincidían con los teóricos. Una vez puesta a punto la técnica, se analizaron 14 aislados con fenotipos sensible y resistente para los fungicidas QoI, obteniéndose un porcentaje de alelos mutados de menos del 70% aproximadamente en los aislados sensibles y mayor del 70% en los aislados resistentes, valores similares a los obtenidos anteriormente en la secuenciación de las construcciones. Debido a la naturaleza mitocondrial de esta resistencia, únicamente la técnica del ARMS-qPCR podría servir como una alternativa rápida de diagnóstico molecular.

Finalmente, el último objetivo de esta tesis doctoral se centró en la búsqueda de herramientas moleculares que pudieran ser incorporadas en programas de monitorización de la resistencia a gran escala, pudiendo así analizar un gran número de aislados en un menor periodo de tiempo, agilizando la generación de resultados y su transmisión a los agricultores. Para completarlo nos centramos en aquellas familias de fungicidas cuya resistencia viniera determinada por mutaciones puntuales, como es el caso de los fungicidas MBC y SDHI. La amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP por sus siglas en inglés (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) es una técnica de amplificación que emplea una DNA polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, de tal manera que la amplificación se puede realizar a una temperatura constante. En combinación con esta polimerasa se emplean cuatro parejas de cebadores, dos externos y dos internos, hibridando estos últimos con seis regiones diferentes del ADN. Esta técnica presenta una serie de ventajas con respecto a la PCR clásica debido a su alta eficacia, rapidez, sensibilidad y especificidad y, es por ello, por lo que ha sido desarrollada para el diagnóstico de la resistencia a diferentes fungicidas en otros patógenos fúngicos como son *Botrytis cinerea* (Fan et al. 2018), *Sclerotinia sclerotiorum* (Duan et al. 2016) o *Fusarium graminearum* (Duan et al. 2014). En esta tesis doctoral se ha desarrollado la técnica LAMP para la detección de las mutaciones responsables de la resistencia a los fungicidas MBC y SDHI (E198A y A86V/G151R, respectivamente) en aislados de *P. xanthii* obtenidos en España y en otros países europeos. Primero se diseñaron cebadores específicos de los alelos resistentes, haciendo coincidir los extremos 3' de los cebadores internos con la mutación puntual responsable de la resistencia. Posteriormente se optimizó la reacción de amplificación, tanto en la concentración de los componentes como en sus condiciones de tiempo y temperatura, y se comprobó la especificidad, sensibilidad y repetibilidad de la técnica. Una

vez puesta a punto la técnica con ADN genómico extraído mediante técnicas convencionales, se optimizó la obtención de genómico de *P. xanthii* empleando un choque térmico para la liberación del ADN desde las esporas, buscando reducir al máximo el tiempo de diagnóstico. Además, se comprobó la eficacia de la técnica a la hora de analizar no sólo aislados monospóricos, formados por un único individuo de *P. xanthii*, sino muestras vegetales tomadas del campo, formadas por una población de aislados del oídio de las cucurbitáceas además de otros patógenos y posibles agentes interferentes de la ampliación. Para las lecturas de los resultados, en el caso de los fungicidas MBC se empleó un indicador de metales, el azul de hidroxinaftol, el cual vira de color violeta a azul cielo cuando la concentración de magnesio libre en el medio disminuye a causa de la amplificación del ADN. Para los fungicidas SDHI se cuantificó la amplificación mediante la detección de fluorescencia, la cual es medida a tiempo real de manera similar a la PCR cuantitativa. En el caso de los fungicidas MBC, se obtuvo amplificación de los aislados portadores de la mutación E198A a los 75 minutos en una reacción LAMP incubada a 65°C. Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante ensayos de sensibilidad a fungicidas en discos de cotiledón. Además, la técnica LAMP resultó ser 100 veces más sensible que la PCR cuando se empleaba material vegetal cuyo ADN no había sido extraído de forma convencional. En el caso de los fungicidas SDHI, la mutación A86V fue amplificada específicamente en 16 minutos a 65°C, mientras que la mutación G151R amplificó a los 21 minutos y 30 segundos, a 62,7°C. Al igual que en el caso anterior, la técnica también se ensayó empleando material vegetal cuyo ADN fue extraído de forma rápida mediante choque térmico. Por otro lado, la amplificación del cambio A86V se obtuvo a los 27 minutos. En resumen, las dos aproximaciones de la técnica LAMP presentadas en esta tesis doctoral presentan ventajas a la hora de ser implementadas en programas de monitorización de resistencia a fungicidas, ya sea por la sencillez de la ejecución o por la rapidez de esta. En el caso de los fungicidas MBC, al emplear un indicador de metales que cambia de color para la lectura de los resultados, para poder llevar a cabo la técnica tan solo es necesario un baño que mantenga la temperatura constante, permitiendo observar los resultados directamente en el tubo donde ha sido llevada a cabo la reacción.

Aunque en el caso de los fungicidas SDHI sea necesario una maquinaria especial para la medida de la fluorescencia, esta permite una cuantificación más objetiva de los resultados, además de que podría ser realizada directamente en el campo ya que la máquina utilizada podría ser transportada fácilmente. La implementación de estas técnicas en programas de monitorización permitiría un seguimiento de la resistencia a fungicidas de una manera rápida y asequible para laboratorios pequeños. Esta monitorización permitiría al agricultor

que los productos químicos empleados en su finca sean realmente eficaces, evitando así tanto la pérdida económica como el vertido al medio ambiente de productos innecesarios. Esto junto con el empleo de otras técnicas de control, como es el uso de cultivares resistentes o el control biológico, permitirían un control más eficaz y sostenible de la enfermedad, pudiendo así evitar los perjuicios asociados a la resistencia a fungicidas.

REFERENCIAS

Analistas Económicos de Andalucía, Unicaja Banco. 2020. El Sector Agrario en Andalucía [citado el 21 abril 2022] Disponible en: <https://www.analistaseconomicos.com/system/files/El%20Sector%20Agrario%20en%20Andaluc%C3%ADa%202020.pdf>.

Averre CW, Wehner TC. 1996. Field identification of selected cucurbit diseases with a hand lens. En: Zitter TA, Hopkins DL, C. E. Thomas, editores. Compendium of cucurbit diseases. Minnesota, Estados Unidos: APS Press. pp. 76–78.

Bellón-Gómez D, Vela-Corcía D, Pérez-García A, Torés JA. 2014. Sensitivity of *Podosphaera xanthii* populations to anti-powdery-mildew fungicides in Spain. Pest Management Science 71:1407–1413.

Duan Y, Zhang X, Ge C, Wang Y, Cao J, Jia X, Wang J, Zhou M. 2014. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. Scientific Reports 4:7094.

Duan Y, Yang Y, Wang Y, Pan X, Wu J, Cai Y, Li T, Zhao D, Wang J, Zhou M. 2016. Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Rapid Detection of the F200Y Mutant Genotype of Carbendazim-Resistant Isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 100:976–983.

Fan F, Yin WX, Li GQ, Lin Y, Luo CX. 2018. Development of a LAMP Method for Detecting SDHI Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea*. Plant Disease 102:1612–1618.

FRAC. 2022. Pathogen Risk List [citado el 21 abril 2022] Disponible en: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf?sfvrsn=caf3489a_2.

Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, López-Ruiz F, Romero D, de Vicente A, Torés JA. 2006. Occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. European Journal of Plant Pathology 115:215–222.

Hirose S, Tanda S, Kiss L, Grigaliunaite B, Havrylenko M, Takamatsu S. 2005. Molecular phylogeny and evolution of the maple powdery mildew (*Sawadea*, *Erysiphaceae*) inferred from nuclear rDNA sequences. Mycological Research. 109:912–922.

Junta de Andalucía, 2022. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. Avance de superficies y producciones [citado el 21 abril 2022] Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/servicios/estadistica-cartografia/estadisticas-agricolas/paginas/avance-superficie-producciones-agricolas.html>.

López-Ruiz FJ, Pérez-García A, Fernández-Ortuño D, Romero D, García E, de Vicente A, Brown JK, Torés JA. 2010. Sensitivities to DMI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. Pest Management Science 66:801–808.

I. RESUMEN

McCreight JD. 2006. Melon-Powdery Mildew Interactions Reveal Variation in Melon Cultigens and *Podosphaera xanthii* Races 1 and 2. Journal of the American Society for Horticultural Science. 131:59–65.

Pérez-García A, Romero D, Fernández-Ortuño D, López-Ruiz F, de Vicente A, Torés JA. 2008. The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits. Molecular Plant Pathology. 10:153–160.

Ridout, CJ. 2009. Profiles in Pathogenesis and Mutualism: Powdery Mildews. En: Deising, HB, editor. Plant Relationships. The Mycota. vol 5. Berlin, Alemania: Springer. pp. 51-68.

Sarhan EAD, Abd-Elsyed MHF, Ebrahiem AMY. 2020. Biological control of cucumber powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) (Castagne) under greenhouse conditions. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 30:65.

Seebold K, Coolong T. 2010. Cultivar evaluations and fungicide programs for managing powdery mildew on pumpkin. Fruit and Vegetable Research Report. pp.40–42.

Villani SM, Cox KD. 2014. Heteroplasmy of the cytochrome b Gene in *Venturia inaequalis* and Its Involvement in Quantitative and Practical Resistance to Trifloxystrobin. Phytopathology 104:945–953.

II.

INTRODUCCIÓN

1. Los oídios.

El oídio, término empleado tanto para la enfermedad como para el hongo causante de la misma, es una de las enfermedades de plantas más extendida y fácilmente reconocible. Esta enfermedad afecta a más de 10.000 especies de angiospermas (Hirose et al. 2005). La sintomatología comienza con la aparición de pequeñas manchas blancas de aspecto polvoriento en la superficie de la hoja del cultivo. Conforme la enfermedad va avanzando, estas manchas se van uniendo hasta cubrir por complejo la superficie de la hoja. Las hojas afectadas sufrirán clorosis hasta secarse por completo, afectando de esta manera a la planta al completo. La capacidad fotosintética se ve reducida, provocando la disminución del rendimiento del cultivo o incluso la senescencia prematura (Averre y Wehner 1996). Otras partes aéreas, como peciolo, tallos y frutos, pueden verse también afectadas. Al tratarse de un hongo biotrofo estricto, requiere del mantenimiento del huésped vivo para poder así obtener nutrientes de este durante todo el transcurso de la infección y, para ello, los oídios han desarrollado mecanismos específicos como por ejemplo evitar los mecanismos de defensa de la planta o tomar nutrientes sin llegar a matar a las células huésped. Esto hace que la mayoría de las especies de oídio posean un rango de huésped muy limitado (Hirose et al. 2005).

Respecto a su taxonomía, la clasificación clásica se revisó en base a los datos de las secuencias espaciadoras transcritas internas del ADN ribosómico o ITS ("*Internal Transcribed Spacer*"), definiéndose de una manera más precisa las relaciones entre los distintos géneros (Braun et al. 2002). De esta manera, los oídos se clasifican dentro de los *Ascomycetes*, formando el orden *Erysiphales* con una única familia, *Erysiphaceae*. Esta familia está subdividida en cinco tribus (*Blumerieae*, *Cystothecae*, *Erysipheae*, *Golovinomycetinae*, *Phyllactinieae*) que a su vez contiene más de 20 géneros diferentes (National Center for Biotechnology Information 2022).

1.1. Ciclo de vida de los oídios.

En general, los oídios poseen un ciclo de vida tanto asexual como sexual (Figura I.1). El ciclo de vida asexual comienza después de que un conidio se deposite sobre un huésped susceptible. El conidio germina y produce un tubo germinal primario corto que se alarga para producir una estructura especializada, el apresorio. Este apresorio es responsable de penetrar en la cutícula y la pared celular de la célula epidérmica de la planta mientras permanece intacto en la membrana plasmática del huésped (Eichmann et al. 2008). La alta presión de turgencia generada en el apresorio, junto con la actividad de una combinación

II. INTRODUCCIÓN

de enzimas líticas, permite que una hifa especializada penetre en la célula epidérmica del huésped y forme un haustorio primario, que comienza a tomar nutrientes desde este (Tucker et al. 2002). Si la infección tiene éxito, las hifas primarias se ramifican y forman hifas secundarias, de las cuales emergen los conidióforos verticalmente, produciendo un número variable de conidios (uno o más) según el género (Heffer et al. 2006; Sidhu et al. 1988; Pérez-García et al. 2009; Gadoury et al. 2012; Saharan et al. 2019). Varios días tras la infección, el crecimiento epifito de estas hifas da como resultado síntomas típicos de la enfermedad que son visibles a simple vista como colonias blancas en la superficie de las plantas.

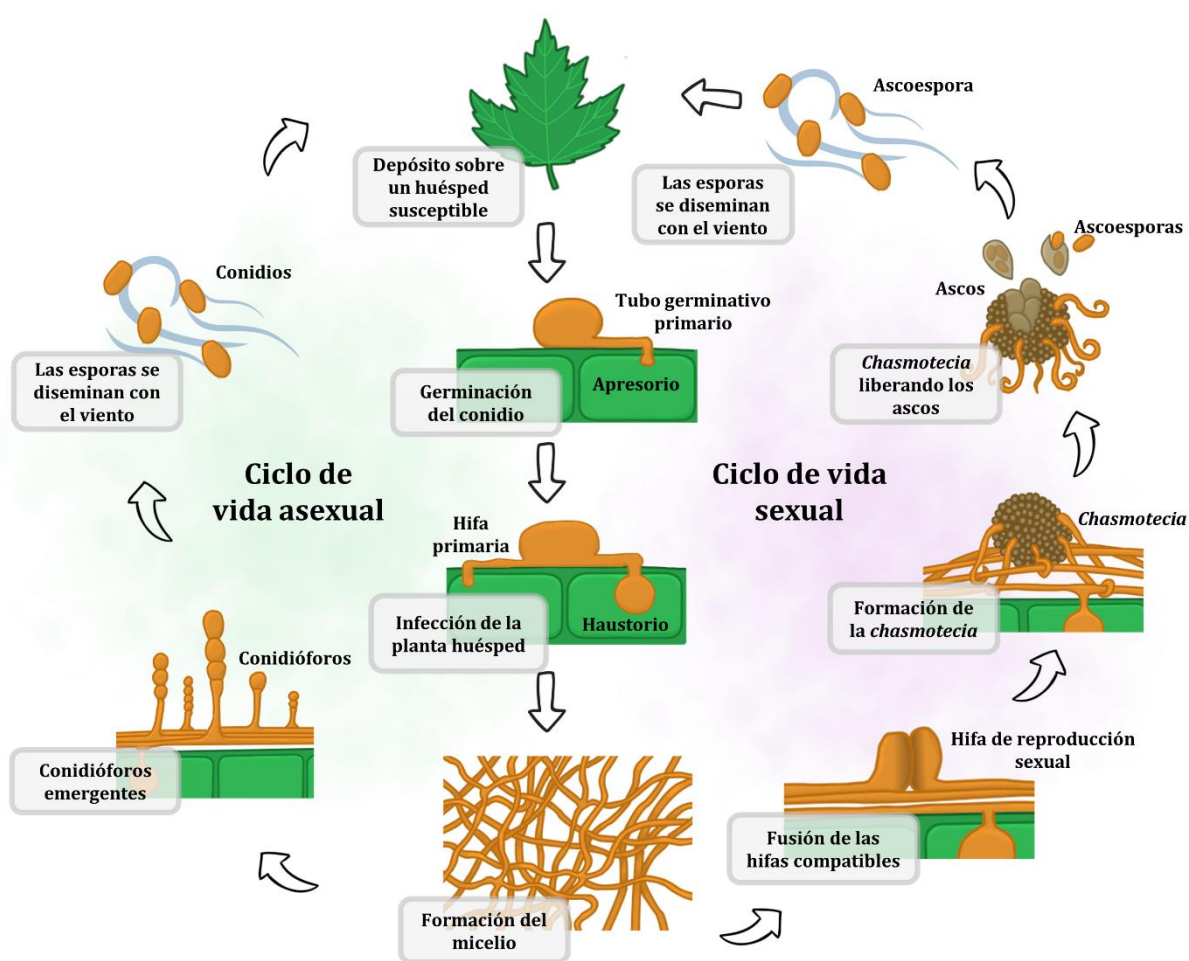


Figura II.1. Ciclo de vida de los oídios.

En el caso de la reproducción sexual, dos hifas compatibles, especializadas para este tipo de reproducción, se fusionan y forman un cuerpo fructífero llamado casmotecio (*chasmothecium*), que contiene, según el género, uno o más ascos portadores de las esporas sexuales o ascosporas (Heffer et al. 2006). Se considera que los casmotecios son una fuente de inóculo para sobrevivir durante el invierno y el verano en ausencia del huésped

compatible (Sidhu et al. 1988; Gadoury et al. 2012; Saharan et al. 2019). Una vez que las ascoporas, normalmente transportadas por el viento, se depositan sobre un huésped susceptible vuelve a dar comienzo un nuevo ciclo de infección (Figura I.1).

1.2. Especies de oídios agrónomicamente importantes.

Aunque los oídios son capaces de infectar a numerosas angiospermas, existen diversas especies cuyos huéspedes poseen especial importancia tanto agronómica como económica, provocando importantes pérdidas en todo el mundo. Estas especies son *Blumeria graminis*, patógeno de diferentes especies de cereales, *Erysiphe necator*, patógeno de la vid, y *Podosphaera xanthii*, patógeno de las cucurbitáceas (Figura II.2).

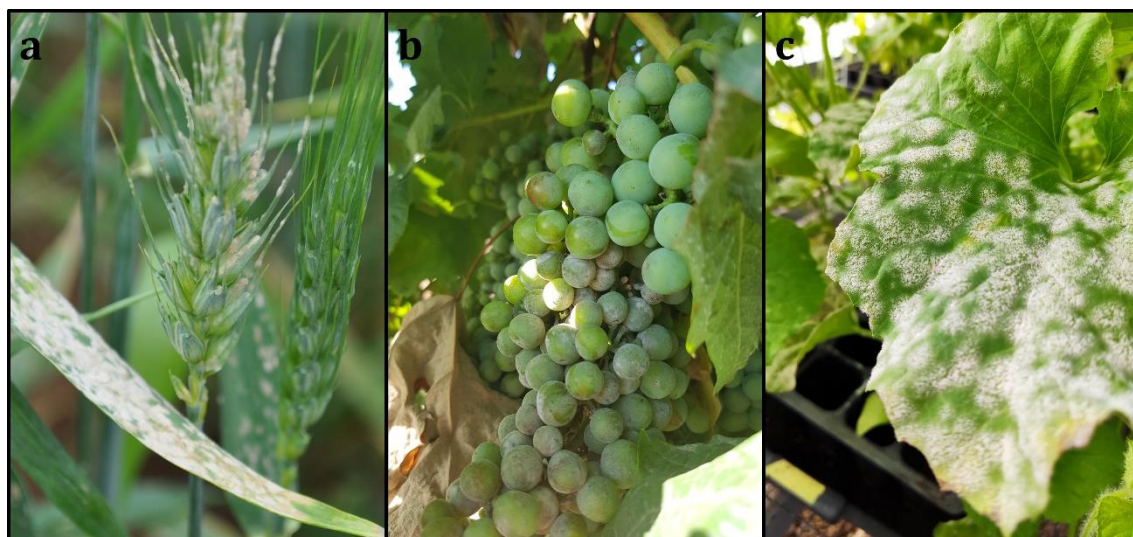


Figura II.2. Sintomatología de las diferentes especies de oídio. Las manchas blancas pueden llegar a cubrir la planta entera. A) *B. graminis* f. sp. *tritici*, B) *E. necator*, C) *P. xanthii*.

Dentro de la especie *B. graminis* se pueden diferenciar diferentes subespecies basándose en la capacidad de infectar a huéspedes con genes de resistencia específicos (Gacek 1983). De esta manera, dentro de *B. graminis* podemos diferenciar *B. graminis* f. sp. *tritici*, que infecta al trigo; *B. graminis* f. sp. *hordei*, la cebada; *B. graminis* f. sp. *avenae*, la avena; *B. graminis* f. sp. *secalis*, el centeno, y *B. graminis* f. sp. *triticales*, el triticale (Troch et al. 2012; Walker et al. 2011). Este oídio posee un ciclo de vida tanto asexual como sexual, siendo el casmotecio una fuente de infección en regiones como el sureste de Europa o los Estados Unidos. Las ascas se liberan en condiciones meteorológicas favorables y dan lugar a infecciones primarias, llegando a desplazarse por el viento y provocando infecciones secundarias a cientos de kilómetros (Zadoks 1967; Hermansen et al. 1978; Götz et al. 1996). La infección se produce en un amplio rango de temperatura, de entre 5-30 °C, siendo la óptima 20 °C, y con una

II. INTRODUCCIÓN

humedad de 50-100 %, viéndose favorecido en situaciones de alta humedad relativa (Pietrusińska y Tratwal 2020). Normalmente los primeros síntomas de la enfermedad se suelen observar en los cereales de invierno, concretamente en el otoño tardío o en el principio de la primavera.

E. necator parasita específicamente a géneros pertenecientes a la familia *Vitaceae*, como son *Cissus*, *Parthenocissus*, *Ampelopsis* y *Vitis* (Pearson y Gaudory 1992), perteneciendo a este último la vid, *V. vinífera*, un cultivo de gran importancia económica y altamente susceptible a *E. necator*. Al igual que *B. graminis*, se ha descrito tanto reproducción sexual como asexual para este patógeno, formando casmotecios para sobrevivir la temporada de invierno y formar un inóculo primario cuando las condiciones ambientales son las adecuadas (Pearson y Gadoury 1987). La infección por ascosporas suele estar favorecida por precipitaciones de 2-3 mm³ con temperaturas por encima de los 10 °C (Gadoury y Pearson 1990). Sin embargo, aunque la lluvia es necesaria para la infección, la humedad constante no es necesaria para la germinación e infección de las ascosporas (Gadoury et al. 2012). El micelio de *E. necator* es capaz de crecer y esporular entre 23 y 30 °C, con un óptimo de 26 °C (Delp 1954), y una humedad relativa del 85 % que vaya disminuyendo progresivamente (Carrol y Wilcox 2003). En estudios genéticos realizados en Europa, Australia e Israel se observó que las poblaciones de *E. necator* estaban formadas por tres grupos genéticamente distintos, A, B e IL, de acuerdo con diferencias en marcadores moleculares (Amrani y Corio-Costet 2006; Délye et al. 1997a; Gur et al. 2021; Miazzi et al. 2003; Núñez et al. 2006; Péros et al. 2005; Stummer et al. 2000). El significado biológico de estos dos grupos no está aún claro (Gadoury et al. 2012), aunque sí se han observado diferencias entre la distribución de los grupos y en su agresividad al infectar diferentes tejidos (Miazzi et al. 2008; Montarry et al. 2008).

La enfermedad del oídio en el cultivo de las cucurbitáceas puede ser causada por tres especies diferentes: *P. xanthii*, *Golovinomyces cichoracearum* y *G. orontii*. Los tres patógenos causan los mismos síntomas en la planta, pero pueden ser fácilmente diferenciados con el uso de un microscopio de campo claro debido a diferencias fenotípicas en sus conidios, como es la presencia de cuerpos de fibrosina en el caso de *P. xanthii* (Braun et al. 2002). En algunos países europeos como Italia y Francia, ambas especies coexisten (Bardin et al. 1999; Pironi 2013). Sin embargo, en España, sólo se ha observado a *P. xanthii* como el único agente causal del oídio en las principales regiones productoras de nuestro país (Del Pino 2002; Fernández-Ortuño et al. 2006; López-Ruiz et al. 2010; Bellón-Gómez et al. 2015). Al contrario que otras especies de oídio, en *P. xanthii* la fase sexual se ha observado raramente

II. INTRODUCCIÓN

en el campo y, por lo tanto, no se ha determinado la relevancia epidemiológica de este ciclo de vida (Pérez-García et al. 2009; Pirondi et al. 2015). El desarrollo de *P. xanthii* está determinado por diversos factores tanto abióticos (temperatura, humedad relativa o iluminación) como bióticos (edad de la planta o susceptibilidad del huésped). La temperatura óptima para el desarrollo de esta especie se encuentra entre los 20 y 27 °C en cultivos de melón, aunque la infección puede ocurrir también desde los 10 hasta los 32 °C (Álvarez 1993; Averre y Wehner 1996). La espora requiere de una humedad relativa del 100% para germinar, disminuyendo la tasa de éxito conforme lo hace el porcentaje de humedad (Álvarez 1993). Sin embargo, hay que tener en cuenta que, de manera general, un exceso de agua sería perjudicial para el desarrollo de los oídios. En cuanto a los ciclos de luz, los fotoperiodos de 12 horas favorecen la tasa de crecimiento micelial y la germinación de los conidios (Álvarez 1993). Además, *P. xanthii* presenta diferentes patotipos o espectro de huéspedes, es decir, cada aislado es capaz de infectar a un rango de especies concretas dentro del grupo de las cucurbitáceas. *P. xanthii* presenta también diferentes razas, sobre todo en melón, llegándose a describir hasta 28 razas diferentes en todo el mundo (McCreight 2006).

2. Métodos de control de los oídios.

De manera general, tanto para el control del oídio como para el manejo de otras enfermedades fúngicas se emplean diferentes métodos que engloban desde las prácticas culturales, el control químico, el empleo de cultivares resistentes o el control biológico. Las prácticas culturales se basan en todas aquellas acciones que puede realizar el agricultor para evitar el contacto entre el patógeno y el huésped, como son la rotación de cultivos, el saneamiento, el control de las condiciones del suelo, la densidad de los cultivos, etc. (Ridout 2009). El control químico protege a la planta antes de la infección, o la cura si ya ha ocurrido, mediante el empleo de distintos compuestos que pueden tanto eliminar al patógeno como activar las defensas propias de la planta (Pérez-García et al. 2009). El empleo de cultivares resistentes emplea diversos cultivares optimizados para evitar la infección por parte del patógeno (McCreight 2006). Por último, los métodos biológicos usan organismos antagonistas o agentes de biocontrol capaces de reducir la cantidad del inóculo del patógeno (Sarhan et al. 2019). Centrándonos en los oídios y, debido a su facilidad de transmisión por el aire y la rapidez de su extensión por el cultivo, los métodos más empleados hoy en día son el control químico y biológico en combinación con ciertos cultivares resistentes (Figura II.3)



Figura II.3. Diferentes métodos de control empleados para el control de los oídios.

2.1. Empleo de cultivares resistentes.

Existen variedades de diferentes cultivos que son resistentes a los oídios debido a la presencia de determinados genes de resistencia, introducidos mediante mejora vegetal, para generar distintas variedades de uso comercial. Sin embargo, el empleo de estas variedades no asegura una erradicación total, sino que simplemente retrasa la infección. Debido a ello, el patógeno se ve sometido a una gran presión de selección, provocando que aparezcan nuevas razas capaces de superar la resistencia, aunque en muy baja proporción. Dependiendo del cultivar, se pueden describir dos clases de resistencia: la monogénica, que puede ser dominante o recesiva (Hückelhoven 2005), y la resistencia otorgada por genes recesivos ligados (Shanmugasundaram et al. 1971). La resistencia monogénica también conocida como resistencia cualitativa o específica de raza, sólo proporciona resistencia total frente a ciertas cepas de oídio, pudiendo perderse dicha resistencia al cabo de los 2-5 años

II. INTRODUCCIÓN

(Álvarez y Torés 1997). La resistencia por genes recesivos, también conocida como resistencia parcial o cuantitativa, no otorga una resistencia absoluta. Al estar implicados un conjunto de genes, su eficacia es más duradera (Álvarez y Torés 1997). Este tipo de resistencia es la que suele ser más empleada en los programas de mejora vegetal, al ser más sencilla de incorporar en variedades agronómicamente importantes.

En general, el uso de cultivares resistentes ha sido una buena herramienta para el control de *B. graminis* (Bennet 1984; Summet y Brown 2013); sin embargo, la capacidad de mutación, la migración de las esporas a largas distancias y la recombinación sexual, ha provocado el fallo de los genes de resistencia de estos cultivares (McDonald y Linde 2002; Niewehner y Leath 1988; Parks et al. 2008; Cowger et al. 2009). Es por ello, por lo que se mantiene una investigación continua de nuevos genes que se puedan incorporar a los cultivares. Hasta ahora se han identificado 67 genes de resistencia cualitativa (Pm1-Pm67) en el trigo (Simeone et al. 2020). Un gen bastante estudiado es MLO (Mildew-Locus-O), descubierto en la cebada en 1942 (Jorgensen 1972) y posteriormente en el trigo (Varallyay et al. 2012), el cual ha demostrado que otorga resistencia a *B. graminis* (Jorgensen 1972; Lyngkjaer et al. 2000; Wang et al. 2014; Acevedo-García et al. 2017).

Prácticamente la totalidad de la producción de vid está centrada en una única especie, *V. vinífera*, la cual solo ha coevolucionado con el oídio desde finales del siglo 19 debido a la introducción accidental de *E. necator* desde Norte América a Europa (Rienth et al. 2021). Por este motivo, este cultivar es altamente sensible al ataque de este patógeno (Kunova et al. 2021) y su control está casi totalmente centrado en el empleo de fungicidas (Gaduory et al. 2012). Sin embargo, en otras especies salvajes sí se pueden encontrar genes de resistencia a diversos patógenos (Fedorina et al. 2022), pudiendo cruzarse con *V. viticola* y generando pies de planta más resistentes tanto a estreses abióticos y bióticos (Fedorina et al. 2022), incluso a *E. necator*, gracias a la introducción del gen de resistencia *Run1* (Wang et al. 2020).

En el caso de *P. xanthii*, variedades de melón, con una resistencia cualitativa, y de pepino, con una resistencia cuantitativa, se han empleado para el control de este patógeno (Perez-García et al. 2009; Fukino et al. 2013; Nunes et al. 2017). Sin embargo, no siempre es posible el desarrollo de un cultivar de cucurbitáceas resistentes. En el caso del género *Cucurbita*, que engloba cultivos como el calabacín o la calabaza, aún no se han definido los genes que otorgan resistencia a las razas a las que son susceptibles (Jahn et al. 2002), aunque en el caso de la calabaza se han empezado a publicar posibles candidatos (Guo et al. 2019; Zhang

et al. 2021). El cultivo de la sandía se consideraba naturalmente resistente al oídio, sin embargo, en los últimos años también se han reportado razas de *P. xanthii* especialmente agresivas capaces de atacar a las diferentes variedades (Jahn et al. 2002, Cohen et al. 2004). A pesar de que el empleo de cultivares resistentes es una opción respetuosa con el medio ambiente y ayuda a retrasar la infección del patógeno, la aparición de estas cepas capaces de superar la resistencia dificulta en gran medida la mejora de las diferentes variedades.

2.2. Control biológico.

El control biológico se define como el uso de organismos vivos, como hongos, bacterias, nemátodos o insectos, para el control de plagas o enfermedades de cultivos de plantas (Ehlers 2011). Su mecanismo de acción es diverso y depende del organismo que se emplee: puede actuar de forma directa mediante la depredación, parasitismo o producción de antibióticos; de forma indirecta mediante la inducción de defensas de la planta; o mediante interacciones medioambientales como la competencia por nutrientes o espacio (Lucas 2017). Sin embargo, este método de control presenta una serie de inconvenientes relacionados con el uso de organismos vivos, ya que se necesitan unas condiciones ambientales concretas para la germinación de las esporas (en el caso de hongos y bacterias), y para que se inicie la acción biótica.

El control biológico del oídio ha ido adquiriendo cada vez más importancia a lo largo de los últimos años debido a los problemas derivados del empleo del uso de fungicidas (Bélanger et al. 1998; Paulitz y Bélanger 2001). En España actualmente hay registrados 9 productos biológicos centrados en el control del oídio de la vid y el de las cucurbitáceas, además de otras especies de oídios y de patógenos; dos de ellos empleando hongos y siete usando bacterias (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2022). Sin embargo, no hay registrado ningún producto para el control biológico del oídio de los cereales. Dentro de las formulaciones comerciales a base de hongos encontramos los productos AQ10 (CBC Iberia) y Polyversium (Agrichem). AQ10 emplea al hongo hiperparásito *Ampelomices quisqualis*, capaz de penetrar con sus hifas tanto en el micelio como en los conidióforos del oídio. En el caso de Polyversium, formulado con el hongo oomiceto *Pythium oligandrum* (cepa M1), se consigue activar el sistema inmune de la planta, además de penetrar en las hifas de manera parasitaria y producir enzimas hidrolíticas que la descomponen. Respecto a los productos que emplean bacterias, sus formulados usan diversas especies del género *Bacillus*, como son *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* y *B. subtilis*. En el caso de *B. amyloliquefaciens* encontramos registrados tres productos comerciales, Taegro (Novozymes France, cepa FZB24), AMYLO-X y Valcure (Mitsui Agrosience International, cepa D747). Estos productos se consideran

II. INTRODUCCIÓN

de amplio espectro y poseen tres modos de acción. Por un lado, mediante la producción de metabolitos secundarios como iturina A y surfactina se inhibe el crecimiento de las hifas y la germinación de las esporas. Por otro, se produce la competición por el espacio sobre las superficies vegetales y, por último, se lleva a cabo la activación de las defensas de la planta. En el caso de *B. pumilus*, sólo la cepa QST 2808 está registrada para formar parte del producto Sonata (Bayer Cropsience). El efecto de esta bacteria es específico para oídios ya que, además de activar las defensas de la planta, afecta a la enzima responsable de la fijación de la glucosa en la pared celular del hongo. Por último, *B. subtilis* tiene dos cepas registradas formando parte de los compuestos Serenade Aso y Serenade MAX (Bayer Cropsience, cepa QSTR 713) y Mildore (Ildainature, cepa IAB/BS03). Estas poseen un modo de acción múltiple entre los que encontramos la inhibición de la germinación de esporas y la destrucción del tubo germinativo y micelio.

2.3. Control químico.

El control químico, basado en el empleo de fungicidas, sigue siendo la principal herramienta para el control de enfermedades fúngicas de plantas. En 2019, de las 61.343 toneladas de plaguicidas empleados en España, englobando herbicidas, insecticidas y fungicidas, más de la mitad (38.067 toneladas) correspondieron a fungicidas (FAOSTAT 2021).

Los fungicidas se clasifican de diferentes maneras de acuerdo con sus características, siendo las más comunes el modo de acción (multisitio o sitio específico; FRAC 2021), la movilidad en planta (contacto o sistémicos; Beckerman 2018) y el tipo de protección (preventivos o curativos; Oliver y Hewitt 2014). Según su modo de acción, encontramos los fungicidas multisitio, los cuales son capaces de inhibir diferentes rutas metabólicas o estructuras celulares, afectando a multitud de hongos, incluso de géneros y especies diferentes. Por otro lado, los fungicidas con un modo de acción específico inhiben puntos concretos de rutas metabólicas, enzimas o proteínas necesarias para el desarrollo e infección del hongo fitopatógeno (FRAC 2021). Respecto a la movilidad en planta, los fungicidas de contacto son aquellos que permanecen en la superficie de las plantas, sin ser absorbidos por la misma; mientras que los fungicidas sistémicos, son absorbidos y redistribuidos. Dentro de estos últimos, hay compuestos que avanzan muy poco, por ejemplo, de un lado al otro de la hoja, y son clasificados como locales o translaminares; otros se introducen en la xilema y avanzan desde el punto de aplicación hacia arriba, conociéndose como sistémicos de movimiento xilemático; por último, los fungicidas sistémicos amfimóviles o sistémicos reales, se distribuyen por el floema y llegan a todos los puntos de la planta, independientemente de su punto de aplicación (Beckerman 2018). Finalmente, dependiendo del tipo protección,

II. INTRODUCCIÓN

encontramos los fungicidas protectores (normalmente también de contacto), que protegen a la planta antes de la llegada del patógeno, dificultando la infección, y los fungicidas curativos (normalmente sistémicos), que pueden erradicar la enfermedad incluso cuando ya se ha producido (Oliver y Hewitt 2014; Figura II.4).

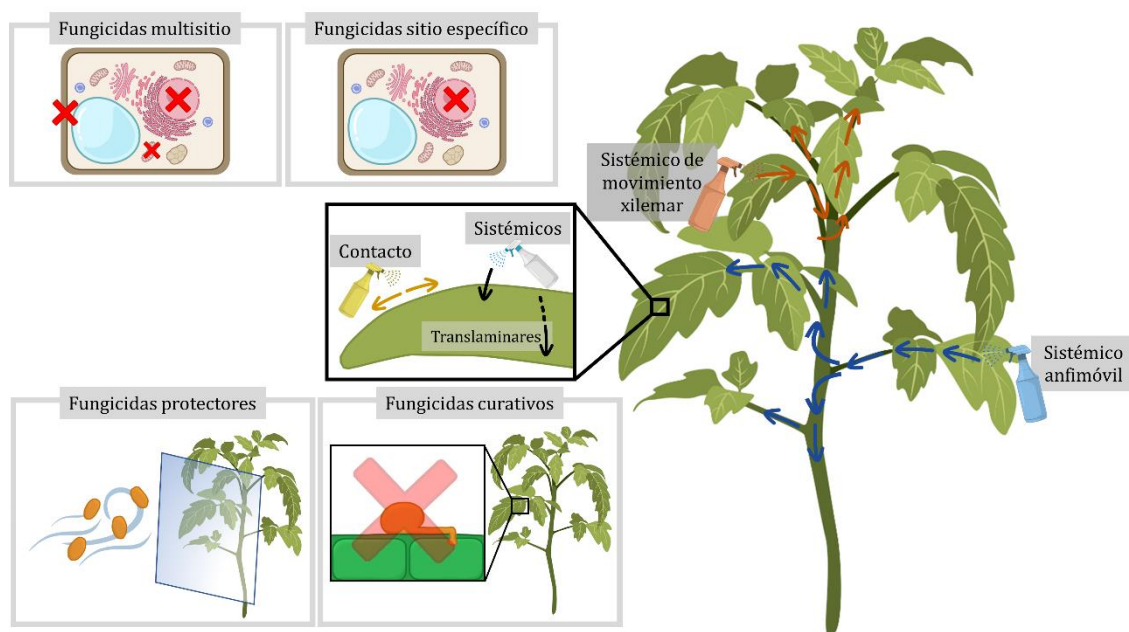


Figura II.4. Esquema de los diferentes tipos de fungicidas, agrupados según su modo de acción (multisitio o sitio específico), tipo de movilidad (contacto o sistémico, estando dentro de estos los translaminares, de movimiento xilemar y anfimóviles) y el tipo de protección (protector o curativo).

El empleo de fungicidas como método de control se remonta a 1824, cuando William Forsyth introdujo el azufre para el control del oídio de árboles frutales (Brent 1985). Posteriormente, en 1885, Millardet presentó el cobre como un prometededor compuesto para combatir el mildiu de la viña *Plasmopara viticola* (Viennot-Bourgin 1985). Los primeros fungicidas orgánicos fueron compuestos organomercuriales, los cuales se registraron a principios del siglo XX para tratar semillas de trigo. A partir de aquí, comenzó el desarrollo de una gran variedad de fungicidas orgánicos, muchos de ellos aún empleamos hoy en día. En los años 30 aparecieron los primeros fungicidas orgánicos con un modo de acción “multisitio”, como fueron los ditiocarbamatos y la ftalimida. El problema de estos compuestos fue que no siempre eran totalmente eficaces, teniendo que ser aplicados frecuentemente y en concentraciones altas, lo que los hacía fitotóxicos (Morton y Staub 2008). Entre 1960 y 1970, aparecieron los primeros fungicidas con un modo de acción específico: los benzimidazoles (fungicidas MBC), las carboximidaz y los primeros inhibidores de la síntesis de esteroides (SBI). La ventaja de estos fungicidas con respecto a los multisitio era que, al actuar sólo sobre ciertos patógenos, su eficacia era mayor y

requería de concentraciones menores. Sin embargo, no todos estos fungicidas eran sistémicos, por lo que eran necesarias varias aplicaciones para su correcto funcionamiento. A partir de estos años comenzaron a registrarse un gran número de fungicidas, la mayoría de ellos sistémicos reales o de movimiento xilemático, los cuales rápidamente dominaron el mercado fitosanitario. Gracias a su modo de acción específico y propiedades sistémicas, el fungicida no era eliminado por la lluvia y se necesitaban menores dosis y aplicaciones para una eficacia mayor que sus antecesores. Por ejemplo, los inhibidores externos de la quinona o fungicidas QoI aumentaron sus ventas un 20% desde 1994 a 2015, y los inhibidores del succinato deshidrogenasa o fungicidas SDHI llegaron a producir 1000 millones de euros, un 8% de las ventas, en 2015, pocos años después de su introducción (Hermann and Stenzel 2019).

3. Resistencia a fungicidas.

Aunque el descubrimiento de los fungicidas sistémicos supuso un hito en la protección de cultivos, junto a ellos apareció asociado el fenómeno de la resistencia, es decir, la capacidad del patógeno diana para sobrevivir a dosis que, en condiciones normales y para la mayoría de la población del hongo, serían letales. Este problema se detectó poco después de registrarse el compuesto benomilo (perteneciente a la familia de los benzimidazoles) en 1970. Las ventajas que otorgaba este fungicida sistémico con respecto a las herramientas disponibles en ese momento, como el azufre, el cobre o los fungicidas “multisitio”, hizo que fuera aplicado muy frecuentemente por parte de los agricultores. Por lo que, pocos años después de su registro, se detectaron fallos en el control de diversas enfermedades como el oídio o la sarna del manzano (Damicone 2014). Hoy en día, debido a que la mayoría de los fungicidas que se emplean son sistémicos, la resistencia es un problema extendido a nivel mundial afectando a más de 200 enfermedades causadas por hongos y casi a la mitad de las familias de fungicidas registradas (Damicone 2014).

Existen diversos mecanismos por los cuales los hongos fitopatógenos desarrollan resistencia, entre los cuales destacan la alteración del sitio de unión del fungicida de tal manera que ya no es reconocido por el mismo, una mayor producción de la proteína diana, el desarrollo de una ruta metabólica alternativa, la detoxificación del fungicida o la expulsión de este a través de transportadores de membrana (Brent y Hollomon 2007). Entre todos ellos, el mecanismo más común es la alteración del sitio de unión del compuesto mediante el desarrollo de mutaciones puntuales por parte del patógeno. Esto hace que la aparición de resistencia a los fungicidas sistémicos sea más fácil y común comparándolos

II. INTRODUCCIÓN

con los fungicidas “multisitio”, ya que la probabilidad de que aparezcan mutaciones simultáneas en diferentes proteínas a la vez es muy baja. Dependiendo del número de mutaciones que haya en el sitio diana del fungicida, se han descrito dos tipos de resistencia: la cualitativa (o disruptiva) y la cuantitativa (o direccional; Brent y Hollomon 2007). Si la resistencia es provocada por una única mutación puntual que altera la diana, hablamos de una resistencia cualitativa. En estos casos, el fallo de control de la enfermedad aparece bruscamente, teniendo claramente una población sensible al fungicida y otra resistente. Este es el caso de los fungicidas MBC (Hawkins y Fraaije 2016) o los fungicidas QoI (Fernández-Ortuño et al. 2008). Si son varias las mutaciones que ocurren en el sitio diana o regiones relacionadas con el mismo, hablamos de resistencia cuantitativa. En este caso, la resistencia suele aparecer gradualmente y suele ser parcial, estando la población fúngica formada por individuos con diferentes grados de resistencia, por lo que cuando se deje de aplicar el fungicida, la población del hongo suele revertir hacia la sensibilidad. Un claro ejemplo de resistencia de tipo cuantitativo suele ser la resistencia a los fungicidas inhibidores de la C14-demetilación o fungicidas DMI (López-Ruiz et al. 2010).

Sin embargo, el desarrollo de la resistencia no ocurre por igual para todas las clases químicas y patógenos, sino que un conjunto de factores puede provocar que cierta pareja fungicida-patógeno sea más propensa a desarrollar una resistencia que derive en un fallo del control significativo, llegando a afectar al manejo de la enfermedad a niveles comerciales. Dentro de los factores de riesgo asociados al fungicida podemos encontrar la familia química a la que pertenece el compuesto químico y su modo de acción. Gracias a estudios de monitorización realizados en el pasado, se ha observado que ciertas clases químicas son más propensas a desarrollar resistencias que otras (Brent y Hollomon 2007). Por ejemplo, los fungicidas basados en cobre o azufre, los ditiocarbamatos o el cloronitrilo no han mostrado, o muy esporádicamente, resistencia en campo incluso después de muchos años de uso. Las 2-amino-pirimidinas, las aminas o la fenhexamida, entre otros, han presentado un riesgo medio, ya que se ha detectado una disminución de la eficacia y algunos aislados resistentes, pero a un nivel limitado (Brent y Hollomon 2007); sin embargo, los benzimidazoles, dicarboximidas, fenilalamidas y los fungicidas QoI son considerados fungicidas de alto riesgo, ya que han sufrido una disminución drástica de la eficacia, comprometiendo el control de la enfermedad en campo, después de 2-10 años tras su registro comercial (Brent y Hollomon 2007). Además, en aquellos fungicidas que tengan un modo de acción similar puede ocurrir el fenómeno conocido como “resistencia cruzada”, como en el caso de los fungicidas QoI, donde la resistencia a una sola materia activa confiere

II. INTRODUCCIÓN

una sensibilidad reducida al resto de los compuestos que forman parte de la misma clase química (Fernández-Ortuño et al. 2006).

Los factores de riesgo relacionados con el patógeno se basan fundamentalmente en aspectos relacionados con su epidemiología, como es el tiempo de generación o la producción de esporas. Aquellos patógenos que poseen un ciclo de vida formado por generaciones cortas se exponen más frecuentemente al fungicida, generándose más rápidamente la resistencia al mismo. Además, una mayor esporulación provoca una mayor presencia de esporas en el cultivo, estando disponibles más genomas individuales que puedan mutar. La capacidad de infección del patógeno también puede influir, ya que existen patógenos que pueden infectar cualquier etapa del ciclo de desarrollo del huésped, siendo necesario repetir el tratamiento de los fungicidas varias veces durante la misma campaña del cultivo. Por último, otro factor intrínseco del patógeno que influye a la hora de desarrollar resistencia está relacionado con habilidad para mutar o desarrollar genes mutantes. De esta manera, la resistencia a los benzimidazoles se desarrolló mucho más lentamente en los patógenos *Oculimacula* spp. que en *P. xanthii*. *Oculimacula* spp., agente causal de la mancha ocular de los cereales, es un patógeno que suele tener una única generación anual, con una producción y diseminación de esporas limitadas, y su control está basado en una única aplicación química por temporada. Sin embargo, *P. xanthii* se caracteriza por tener generaciones cortas, esporulación abundante y una dispersión generalizada que requiere repetidos tratamientos con fungicidas a lo largo del ciclo del cultivo (Brent y Hollomon 2007; Mikaberidze et al. 2017).

A estos dos factores de riesgo, los inherentes al fungicida y al patógeno, hay que incluirles un factor de riesgo externo, conocido como riesgo agronómico, que también puede aumentar la presión de selección sobre el patógeno (European and Mediterranean Plant Protection Organization 2015). Este está determinado por las condiciones de uso del fungicida y ciertas prácticas llevadas a cabo por el agricultor, junto con características particulares del cultivo y la zona geográfica donde se realiza (Brent y Hollomon 2007). El factor de riesgo agronómico incluye:

- número de aplicaciones repetidas del fungicida de riesgo;
- tratamientos exclusivos y no combinaciones de ellos;
- cantidad de dosis aplicada inadecuada;
- necesidad de un gran número de aplicaciones o exposición prolongada para obtener el control;

II. INTRODUCCIÓN

- el uso de cultivos extensos con rotaciones cortas o de monocultivos;
- uso de cultivares susceptibles a la enfermedad;
- aislamiento geográfico de las poblaciones, como el uso de invernaderos, que impide el reingreso de formas sensibles;
- condiciones ambientales que favorecen generaciones más frecuentes o densidades de población más altas del patógeno, como por ejemplo en cultivos protegidos como invernaderos o politúneles;
- el no uso de un control integrado de la enfermedad que combine diferentes técnicas.

Tal y como se muestra en la Figura II.5, el riesgo del patógeno se combina con el del fungicida y la probabilidad total se puede ver incrementada por el riesgo agronómico. En general, el riesgo combinado teórico que se obtiene para cada pareja patógeno-fungicida se ajusta a la experiencia práctica que se obtiene en el campo (Lucas 2017).

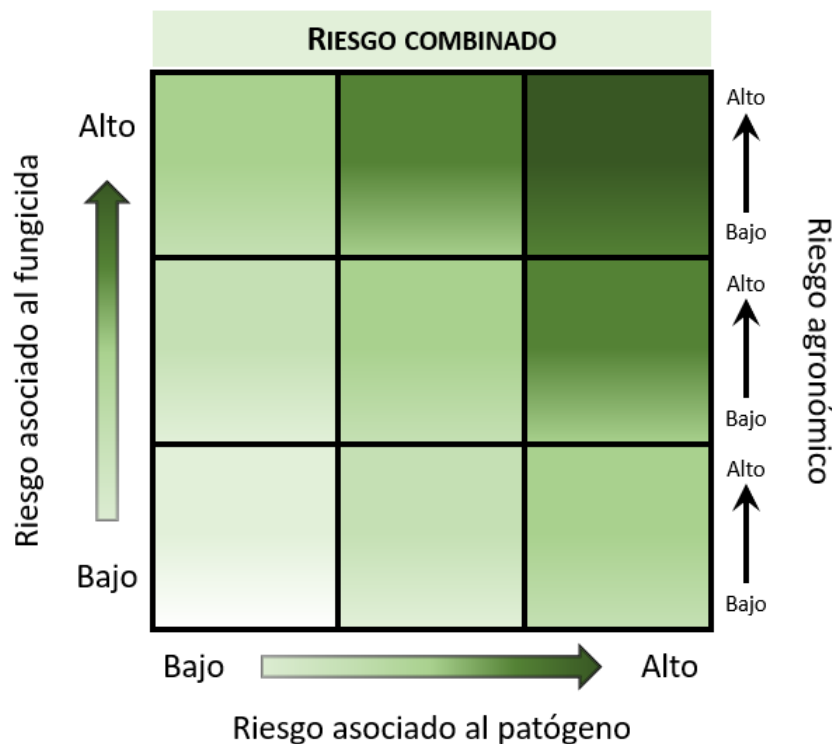


Figura II.5. Representación de una matriz del riesgo de desarrollo de resistencia. El riesgo inicial está formado por el riesgo asociado al fungicida y al patógeno. Dentro de cada grupo, el resultado se ve a su vez incrementado por el riesgo agronómico, dando así el riesgo combinado final. El aumento de intensidad del color indica una mayor probabilidad de desarrollo de resistencia (basado en Lucas JA 2017).

II. INTRODUCCIÓN

Hoy en día en España se encuentran registrados 30 materias activas pertenecientes a 10 familias diferentes para el control de los oídios (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2022): las aminas o morfolinas (código FRAC 5), con la spiroxamina y el fenpropidin; las aril-fenil-cetonas (código FRAC 50), con la metrafenona y la piriofenona; los aza-naftalenos (código FRAC 13), con el proquinazid; los dinitrofenilos (código FRAC 29), con el meptildinocap; las fenil-acetamidas (código FRAC U06), con el ciflufenamid; los inhibidores de la demetilación o fungicidas DMI (código FRAC 3), con once materias activas registradas (bromuconazol, difenoconazol, fenbuconazol, mefentrifluconazol, metconazol, miclobutanil, penconazol, procloraz, protioconazol, tebuconazol y tetraconazol); los fungicidas MBC (código FRAC 1), con el tiofanato de metilo; los fungicidas QoI (código FRAC 11), con cuatro materias activas registradas (azoxistrobina, piraclostrobina, kresoxim-metil y trifloxistrobina); los fungicidas SDHI (código FRAC 7), con seis materias activas registradas (bixafen, boscalida, fluopiram, fluxapiraxad, isopirazam y pentiopirad); y, finalmente, los hidroxil (2-amino-) pirimidinas (código FRAC 8), con el bupirimato. Dentro de estas 10 familias, las más comercializadas debido a características de sus materias activas, como su movilidad en planta, su baja fitotoxicidad y su capacidad de controlar no sólo el oídio sino también otros hongos fitopatógenos, entre otros, son los fungicidas DMI, los fungicidas MBC, los fungicidas QoI y los fungicidas SDHI, siendo esta última la familia más recientemente introducida. Estas ventajas con respecto a otros fungicidas han hecho que se hayan empleado con más frecuencia e intensidad, provocando una mayor aparición de resistencia no sólo en oídios, sino también en otros hongos.

3.1. Resistencia a los fungicidas DMI.

Los esteroides son componentes fundamentales en el mantenimiento de la integridad de la membrana, estando presentes en todos los eucariotas. El ergosterol, el esteroide principal en la mayoría de los hongos, es sintetizado *de novo* a partir del acetil-CoA, y una reducción de este provoca alteraciones en la membrana y pérdidas de electrolitos (Oliver y Hewitt 2014). Los fungicidas SBI basan su modo de acción en la inhibición de la biosíntesis de este esteroide. Esta ruta de biosíntesis está conservada en todos los hongos (incluyendo Ascomicetos y Basidiomicetos), por lo que el espectro de acción de estos fungicidas incluye a todos ellos, pero excluye a los Oomicetos, los cuales adquieren el ergosterol a partir del huésped que infectan (Oliver y Hewitt 2014). Los fungicidas SBI inicialmente se desarrollaron para combatir diversas enfermedades fúngicas humanas (Hippe 1991), pero debido a su buen rendimiento, al final de los años 60 ya se estaban comercializando compuestos similares para el control de enfermedades fúngicas en diferentes cultivos (Oliver y Hewitt 2014).

II. INTRODUCCIÓN

El grupo más importante dentro de los SBI son los fungicidas DMI, siendo el grupo con más materias activas registradas (37 en 2022; FRAC 2022). Estos fungicidas inhiben la eliminación del grupo C14-metilo del lanosterol, provocando la disminución del ergosterol y la acumulación de este y otros compuestos 14-metilados potencialmente tóxicos (Steffend et al. 1996; figura II.6). Esto conlleva a una desestabilización de la membrana plasmática, haciéndola más vulnerable, y de la actividad de proteínas de membrana, como aquellas encargadas del transporte de nutrientes y biosíntesis de la quitina (Georgopapadakou y Walsh 1996). El sitio de unión de los fungicidas DMI es la enzima CYP51, una P450 monoxigenasa, siendo las diferencias de unión a la fracción hemo de esta enzima lo que puede explicar la diferencia de rendimiento entre los diferentes DMI (Gisi et al. 1986).

En cuanto a los mecanismos moleculares que confieren resistencia, al contrario que ocurre con la mayoría de los fungicidas específicos de sitio, donde una única mutación puntual confiere resistencia, en los fungicidas DMI suele venir asociada por una combinación de diferentes mecanismos (Lamb et al. 1999; Lupetti et al. 2002; Sanglard 2002). En hongos filamentosos se han descrito cinco mecanismos:

1. Disminución en la permeabilidad de la membrana y cambios en la composición de la pared celular (Georgopapadakou y Walsh 1996);
2. Alteración del sitio de unión, que produce una reducción de la afinidad del inhibidor, mediante varias mutaciones puntuales como los cambios Y136F, K147Q o S509T (Délye et al. 1997b; Délye et al. 1998; Wyand y Brown, 2005; Zhan et al. 2006);
3. Aumento del transporte activo mediado por la sobreexpresión de transportadores como transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) y los transportadores MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (Stergiopoulos et al. 2002; Cools et al. 2005);
4. Aumento del nivel de expresión del gen *cyp51* (Stergiopoulos et al., 2003; Schnabel y Jones, 2001);
5. Mutaciones compensatorias en la $\Delta^{5,6}$ -desaturasa (Georgopapadakou y Walsh 1996; Sanglard et al. 2003), inactivándola y evitando la formación de compuestos intermediarios tóxicos.

3.2. Resistencia a los fungicidas MBC.

Los fungicidas MBC son una familia de fungicidas sistémicos cuyo modo de acción está basado en inhibir el ensamblaje de la β -tubulina durante la mitosis (figura II.6). Existen varias materias activas englobadas en esta familia, las cuales están organizadas en dos

II. INTRODUCCIÓN

grupos: los benzimidazoles, a los que pertenecen el benomilo, la carbendazima, el fuberidazol y el tiabendazol; y los tiofanatos, formados por el tiofanato y el metil tiofanato.

Los fungicidas MBC se registraron por primera vez en los años 60 con la materia activa benomilo, y debido a ser uno de los primeros fungicidas sistémicos y a su amplio espectro de acción, su uso se extendió rápidamente por todo el mundo. Hoy en día se emplean para controlar diferentes enfermedades fúngicas en más de 60 cultivos. Su modo de acción está basado en la integridad de la β -tubulina (Oliver y Hewitt 2014). Los microtúbulos, formados por hélices alternas de α - y β -tubulinas, son una parte esencial del citoesqueleto, de la formación del huso y de la segregación de los cromosomas en la división celular. Los fungicidas MBC interrumpen la mitosis durante la metafase de la división celular, provocando la muerte de la célula (Davidse 1986). Son las diferencias estructurales en los sitios de unión de los microtúbulos, una estructura muy conservada en los eucariotas, lo que permite que los fungicidas MBC inhiban específicamente a los todos los hongos Ascomycetos y algunos Basidiomycetos, y no a los Oomicetos ni a las plantas (Oliver y Hewitt 2014; Young 2015).

Gracias a las técnicas de biología molecular, se han descrito dos cambios aminoacídicos que están relacionados con la resistencia: el cambio de fenilalanina a tirosina en la posición 200 del gen de la β -tubulina (F200Y), y el cambio de arginina a histidina, glicina o lisina en la posición 198 (E198A/G/K). Un gran número de especies han desarrollado resistencia a través de estas mutaciones y han provocado serios problemas de control de la enfermedad en campo (Hawkins y Fraaije 2016).

3.3. Resistencia a los fungicidas QoI.

Los fungicidas QoI son uno de los grupos más comercializados hoy en día, empleándose en más de 80 cultivos para controlar importantes enfermedades fúngicas en más de 70 países (Sierotzki 2015), generando ingresos anuales de mil millones de dólares (Oliver y Hewitt 2014).

El desarrollo de los fungicidas QoI tiene lugar gracias al descubrimiento un grupo de moléculas de origen natural derivadas del ácido β -metoxiacrílico. En 1977, Anke y colaboradores aislaron la estrobilurina A y estrobilurina B del hongo basidiomiceto *Strobilurus tenacellus*, dos moléculas con actividad antifúngica (Anke et al. 1977). En 1992, la multinacional del sector fitosanitario BASF anunció uno de los primeros fungicidas agrícolas obtenido a partir del análogo sintético del metoximinoacetato, el kresoxim-metil

II. INTRODUCCIÓN

(Balba 2007). Debido a su amplio espectro de acción, cubriendo la mayoría de Oomicetos y Basidiomicetos y todos los Ascomicetos; además de la ausencia de toxicidad en plantas, animales y personas gracias a su rápida degradación, su popularidad y, por tanto, uso, aumentó rápidamente. Pocos años después se desarrollaron y registraron el resto de las materias activas que conforman esta familia (Balba 2007).

El modo de acción de los fungicidas QoI fue elucidado por Becker y colaboradores en 1981. El fungicida interfiere con la transferencia de electrones al sitio Qo (el sitio externo de la oxidación del quinol) del complejo del citocromo bc1 o complejo III de la respiración mitocondrial (figura II.6). Este bloqueo del tránsito de electrones provoca un déficit de energía en las células fúngicas al no poder sintetizarse ATP (Becker et al. 1981). La resistencia a los fungicidas QoI ha sido descrita en todo el mundo, observándose aislados resistentes en más de 60 enfermedades de plantas, viéndose reducida la eficacia de estos compuestos en la naturaleza (Ishii y Hollomon 2015).

El gen del citocromo b, *cytb*, está codificado en el ADN mitocondrial y forma parte de la diana molecular de los fungicidas QoI. En la literatura, se han descrito dos mutaciones puntuales que son responsables de la resistencia en la mayoría de patógenos de plantas: el cambio de glicina a alanina en la posición 143 (G143A) y de fenilalanina a leucina en la posición 129 (F129L) (Sierotzki 2015). El cambio G143A es el que tiene asociado niveles de resistencia más altos, además de ser el más común en patógenos fúngicos, provocado por una serie de interferencias estéricas con el sitio de unión al fungicida (Esser et al. 2004; Sierotzki et al. 2007). El otro cambio, F129L, se encuentra ubicado en el grupo hemo de la proteína e interfiere con una de las partes de unión a la molécula QoI, siendo los niveles de resistencia que otorga mucho menor en comparación con el cambio G143A (Esser et al. 2004; Sierotzki et al. 2007). Se han descrito algunos trabajos, tanto en oídios como en otros hongos fitopatógenos, donde no todos los aislados con resistencia a los fungicidas QoI mostraban estos cambios aminoacídicos (Fernández-Ortuño et al. 2008; Ishii et al. 2001). Existe un fenómeno en el ADN mitocondrial conocido como heteroplasmia, descrito como la presencia simultánea de diferentes alelos en el ADN mitocondrial de una misma célula, otorgando el fenotipo final aquel que se encuentre en un mayor porcentaje (Stefano et al. 2017). Este fenómeno ha sido confirmado, a través del cambio G143A, como el mecanismo de resistencia en patógenos como *B. graminis* f. sp. *tritici* (Fraaije et al. 2002), *Botrytis cinerea* (Hashimoto et al. 2014), *P. leucotricha* (Lesemann et al. 2006) y *Venturia inaequalis* (Villani y Cox 2014).

3.4. Resistencia a los fungicidas SDHI.

En los últimos años, una de las familias de fungicidas que más importancia está adquiriendo en el mercado de los fitosanitarios son los fungicidas SDHI. Hoy en día hay registradas 23 materias activas organizadas en once clases químicas (FRAC 2022).

A partir de los años 60, los primeros fungicidas SDHI registrados fueron las oxicarboxina y carboxina (Ulrich y Mathre 1972). Estos dos compuestos se empleaban fundamentalmente para el control de Basidiomicetos como *Rhizoctonia* spp., *Ustilago* spp. y *Tilletia caries* en algodón, cereales, colza, leguminosas y maíz (Oliver y Hewitt 2014). En 1974 se comercializaron los análogos estructurales benodanilo y fenfuram, y entre los años 80 y 90 las materias activas mepronio, flurolanilo, furamerpyr y tifluzamida; todos ellos aún con un espectro de acción muy específico. Sin embargo, en 2003 se lanzó al mercado la boscalida, un fungicida SDHI capaz de controlar un mayor número de patógenos fúngicos en diversos cultivos como cereales, uvas y verduras (Stammler et al. 2008). Con esta materia como punto de partida, en menos de una década numerosas empresas desarrollaron otros fungicidas SDHI con características similares en cuanto a actividad y movilidad en planta.

El modo de acción de los fungicidas SDHI está basado en la inhibición del succinato deshidrogenasa o complejo II de la cadena de transporte de electrones. Esto se produce en la interacción del inhibidor con el sitio de unión de la ubiquinona (Ruprecht et al. 2009; figura II.6). Este sitio de unión es un bolsillo hidrofóbico formado por las subunidades B, C y D del succinato y está muy conservado entre diversos organismos (Hägerhäll 1997; Horsefield et al. 2004). El complejo II contribuye tanto al flujo de electrones como al ciclo del ácido cítrico, de tal manera que una inhibición de este provoca el déficit de ATP y la liberación de oxígeno activo, provocando la muerte celular en el patógeno.

A nivel molecular se ha observado que la resistencia a los fungicidas SDHI viene determinada por mutaciones puntuales en las tres subunidades que forman el bolsillo de unión de la ubiquinona. Se han descrito más de 40 mutaciones diferentes en diversos patógenos, como *Alternaria alternata* (Avenot et al. 2008, 2009, 2014, 2019; Yang et al. 2015), *B. cinerea* (Leroux et al. 2010; Veloukas et al. 2011; Yin et al. 2011; Amiri et al. 2014; Hu et al. 2016; Fernández-Ortuño et al. 2012), *Didymella bryionidae* (Avenot et al. 2012) y *Pyrenophora teres* (Rehfus et al. 2016) entre otros.

II. INTRODUCCIÓN

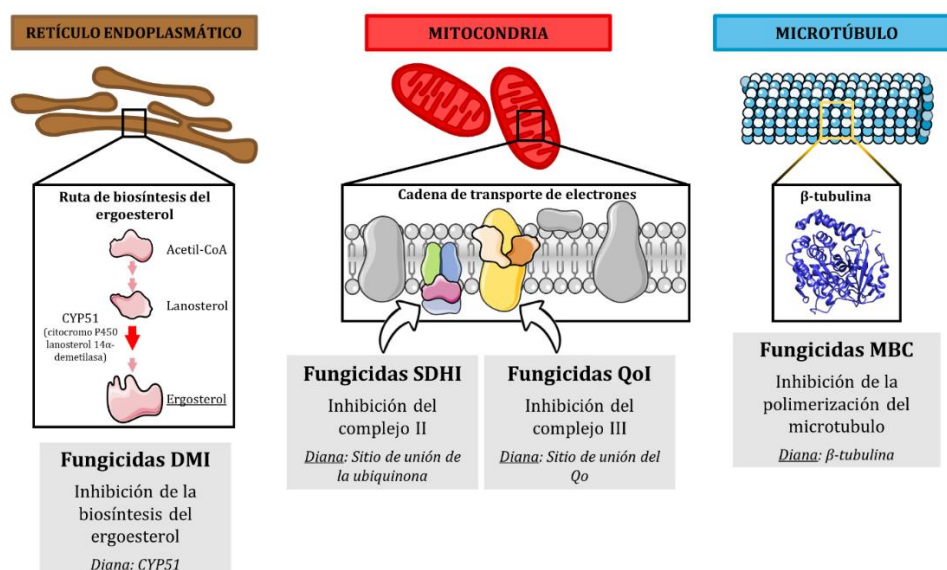


Figura II.6. Mecanismos de acción de los fungicidas DMI (marrón), fungicidas SDHI (rojo), fungicidas QoI (rojo) y fungicidas MBC (azul).

4. Programas de monitorización de la resistencia a fungicidas.

Los programas de control de la resistencia a fungicidas pretenden retrasar al máximo la emergencia de ésta el mayor tiempo posible (van den Bosch et al. 2014; Shaw 2006). Idealmente, el manejo de las resistencias debería estar formado por tres elementos principales: la predicción de la probabilidad de la aparición de resistencia, la detección temprana, y el desarrollo de técnicas para reducir la selección de esta en la naturaleza una vez que ya ha aparecido (Lucas 2017). Para evitar la aparición de resistencias, son varias las recomendaciones generales que se dan a los agricultores para intentar extender al máximo la vida útil de los fungicidas que tienen disponibles. Algunas de estas recomendaciones incluyen, por ejemplo, la rotación de cultivos, la mezcla de las diferentes clases químicas registradas y la restricción del número de aplicaciones por temporada, entre otras (Wade 1988). Estas estrategias son muy útiles, sobre todo en aquellos patógenos que aún no han desarrollado resistencia, pero pueden fallar en situaciones donde la multirresistencia a diferentes clases de fungicidas ya se encuentra presente en la población del patógeno. Por ello, es importante mantener una monitorización de los niveles de resistencia, observando y detectando los cambios en la sensibilidad de una población del patógeno a uno o más fungicidas de interés (Corio-Costet 2015). Para que la monitorización sea lo más representativa posible, debería llevarse a cabo durante varios años y en varias localizaciones y, aunque esto implique monitorizar regularmente grandes áreas de trabajo con el coste que implica, este gasto estará justificado en situaciones de alto riesgo comercial. Por último, hay que tener también en cuenta que las pérdidas de eficacia de un fungicida no

siempre deben traducirse en aparición de resistencia por parte del patógeno, ya que pueden estar involucradas prácticas culturales inadecuadas, tales como dosis insuficientes y tratamientos mal dirigidos o erróneos.

4.1. Ensayos biológicos: Determinación de la sensibilidad basal y dosis discriminatoria.

La identificación de la sensibilidad basal se basa en realizar una monitorización temprana para obtener los datos de sensibilidad de una población antes de que haya sido expuesta a cualquier uso extensivo de un fungicida (Brent y Hollomon 2007). Para calcular la sensibilidad basal, se recogen muestras del patógeno de áreas donde no se haya empleado el fungicida de estudio (o no de forma extensiva), siendo necesario que provenga de varias localizaciones, y se estiman dos valores, la Concentración Efectiva 50 (CE_{50}) y la concentración de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI; Figura I.7). La CE_{50} se define como la concentración a la cual el 50% de la población del patógeno se ve inhibida; mientras que la CMI, es la concentración mínima que inhibe totalmente el desarrollo del patógeno (Russel 2006).

Los ensayos de sensibilidad se pueden realizar *in vitro* mediante ensayos de germinación o de crecimiento del tubo germinativo (Weber y Hahn 2011), o a través de ensayos de desarrollo del micelio (Brent 1988). Basándose en los resultados *in vitro*, se seleccionan aislados con bajo, medio y altos valores de CE_{50} (representando así el rango entero de sensibilidad) que, posteriormente, se emplean en ensayos *in vivo*, infectando el huésped diana con el patógeno y aplicándole diferentes concentraciones seleccionadas del fungicida de estudio. Se espera que los aislados con altos valores de CE_{50} (o incluso aquellos con valores medios) sean capaces de desarrollar la enfermedad en planta. Comparando los resultados de la sensibilidad basal de los ensayos *in vitro* e *in vivo* se pueden determinar una o varias dosis discriminatorias (DD) que permitan diferenciar entre aislados sensibles y resistentes en ensayos de monitorización a gran escala en los que se analizan un gran número de aislados (Schnabel et al. 2015; Russel 2006). Esta DD suele ser entre 5 y 10 veces más alta que la media de la CMI o al menos 10 veces mayor que la CE_{50} (Corio-Costet 2015). Sin embargo, dependiendo del tipo de resistencia, la determinación de esta dosis discriminatoria puede ser más o menos sencilla. Por ejemplo, si la resistencia es cualitativa, la dosis discriminante es fácil de determinar y suele ser única (Chen et al. 2007; Corio-Costet et al. 2011; Gisi et al. 2002; Grasso et al. 2006). Sin embargo, si la resistencia es multigénica o cuantitativa, se necesitan varios años para observar la aparición de resistencia en el campo. En estos casos es más difícil determinar una única dosis discriminante por lo que en

ensayos de monitorización a gran escala suelen utilizarse varias concentraciones de dosis discriminantes, buscando detectar los diferentes fenotipos otorgados por este tipo de resistencia (Corio-Costet 2015).

Además de la información obtenida con la sensibilidad basal, también es importante observar las diferencias de crecimiento y patogenicidad entre aislados con diferentes CE_{50} . Diferencias entre la ratio de crecimiento, la esporulación, el aspecto del micelio y la patogenicidad nos podría aportar más información sobre la posible supervivencia del aislado resistente en la naturaleza (Corio-Costet 2015).

4.2. Ensayos moleculares: Detección y cuantificación de mutaciones puntuales.

Cuando se conocen los mecanismos moleculares de la resistencia y estos están basados en mutaciones puntuales en la diana del fungicida, las técnicas moleculares pueden sortear las limitaciones asociadas a los ensayos biológicos *in vitro*. Con las técnicas moleculares, la detección de la resistencia a fungicidas se puede conocer más rápidamente y, por tanto, permite dar recomendaciones a los agricultores sobre las diferentes estrategias anti-resistencia de las que dispone con suficiente antelación antes de la pérdida del cultivo (Dodhia et al. 2021).

A lo largo del tiempo se han ido desarrollando diversas técnicas basadas en la detección de los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Sambrook et al. 1989), buscando identificar genotipos resistentes. Normalmente el ADN es purificado del material vegetal infectado, evitando así la necesidad de aislar previamente el patógeno y mantenerlo en el laboratorio. Algunas de las técnicas más utilizadas para la detección molecular de la resistencia a fungicidas se describen a continuación (Figura I.7).

4.2.1. Detección mediante el empleo de sondas alelo-específicas.

El empleo de sondas alelo-específicas se basa en la actividad 5' exonucleasa de la *Taq* polimerasa y el uso de sondas específicas marcadas. Estas sondas poseen un fluoróforo unido a su extremo 5' y un inhibidor de este en el extremo 3', y siempre que estén próximos se inhibirá cualquier señal de fluorescencia (Lee et al. 1993). Durante el proceso de amplificación de la PCR, cuando la sonda es alcanzada por la *Taq* polimerasa, la actividad 5' exonucleasa degradará el extremo con el fluoróforo, liberándolo y separando del inhibidor, emitiendo fluorescencia que podrá ser detectada con el equipo adecuada. Esta fluorescencia es directamente proporcional al fluoróforo liberado y a la cantidad de molde de ADN

presente en la reacción PCR. Si la sonda es diseñada para hibridar específicamente a la mutación del aislado resistente, la detección de fluorescencia será equivalente a la presencia del cambio de nucleótido responsable del cambio aminoacídico. Estas sondas han sido usadas para la identificación de las mutaciones responsables de la resistencia al fungicida fenhexamida en *B. cinerea* (Billard et al. 2012), la detección del cambio G143A en citocromo b en *E. necator* para los fungicidas QoI (Miles et al. 2020), en el análisis de la resistencia a los fungicidas MBC a través de las sustituciones en β -tubulina F167Y, E198Q/L/K y F200Y en *Fusarium graminearum* (Zhang et al. 2016) o E198A/L y F200Y en *V. inaequalis* (Koenraadt y Jones 1992), entre otras.

4.2.2. Detección mediante RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Las enzimas de restricción reconocen secuencias cortas y específicas del ADN y escinden las dos cadenas en estos sitios. Mediante el empleo de estas enzimas, el cambio de un nucleótido en dicha secuencia es fácilmente reconocible al crear o destruir un sitio de restricción nuevo. Para la detección de resistencia a un determinado fungicida de un aislado, el gen de interés es amplificado mediante PCR y el producto resultante sería digerido con una enzima de restricción cuyo sitio de corte incluya la mutación responsable. Posteriormente, el producto de la digestión se separaría en un gel de agarosa y se podría diferenciar el aislado sensible del resistente según el patrón de cortes que presente cada uno. Aunque esta técnica no es cuantitativa, al no necesitar equipamiento sofisticado, ha sido muy empleada en estudios de monitorización como, por ejemplo, la detección de la resistencia a los fungicidas QoI en aislados de *A. alternata* (Wang et al. 2021), *Cercospora beticola* (Rosenzweig et al. 2015) y *C. soja* (Standish et al. 2015); a los fungicidas MBC en *B. cinerea* (Saito et al. 2009), *C. beticola* (Rosenzweig et al. 2015), *Pyrenopeziza brassicae* (Carter et al. 2013); la resistencia a los fungicidas DMI determinada por la inserción 'Mona' en *Monilinia fruticola* (Luo et al. 2008); la resistencia a los fenilcarbamatos en *B. cinerea* (Saito et al. 2009) y al fungicida fenamacril, perteneciente a los cianoacrilatos (código FRAC 47) en *F. graminearum* (Li et al. 2020).

Si el sitio de corte en el que se encuentra la mutación es reconocido por una enzima que no sea asequible, se puede emplear una técnica alternativa denominada PIRA-PCR (*Primer Introduced Restriction Enzyme Analysis PCR*) basada en la introducción de sitios de corte de enzimas de interés. Esta técnica ha sido empleada para la detección de resistencia a carbendazima en *F. graminearum* (Luo et al. 2009) y la resistencia a boscalida en *B. cinerea* (Veloukas et al. 2011).

4.2.3. Detección mediante AS-PCR/ARMS-PCR (*Allele-Specific PCR/Amplification Refractory Mutation System PCR*).

La PCR específica de alelo o Sistema de Mutación Refractario a la Amplificación por PCR se basa en la detección de alelos que difieren en cambios puntuales de nucleótidos usando cebadores que poseen el extremo 3' complementario a dichos cambios (Gaudet et al. 2009). De esta manera y a modo de ejemplo, para un cambio de guanina a adenina, un cebador cuyo extremo 3' es complementario a la guanina presente en el alelo mutante no amplificará el alelo silvestre, el cual presenta una adenina en la misma posición. Además de cambiar la base de la última posición del cebador, se puede añadir un nucleótido que no hibride con su complementario en la secuencia diana en la penúltima posición y dificultar la amplificación del alelo no deseado. Esta técnica se ha utilizado para detectar numerosas mutaciones implicadas en la resistencia a distintas clases químicas y diversos patógenos fúngicos (Délye et al. 1997b; Baumler et al. 2003; Jiang et al. 2009; De Miccolis Angelini et al. 2014; Vela-Corcía et al. 2014; Hu et al. 2018; Lichtemberg et al. 2018).

En otros trabajos, esta técnica ha sido combinada con otras metodologías, como es el marcaje con sondas (Avenot et al. 2008). El empleo del marcaje de sondas con fluorocromos que emitan fluorescencia con diferentes longitudes de onda permite la combinación de cebadores en una misma reacción, permitiendo así la detección simultánea de varias dianas (Yin et al. 2010; Yin et al. 2013; Mallik et al. 2014).

4.2.4. Detección mediante qPCR (*Quantitative PCR*).

En el manejo de la enfermedad no sólo se requiere información de la presencia o ausencia de aislados resistentes, sino también conocer su frecuencia en la población y, para ello, el método más empleado para la cuantificación de alelos es la PCR cuantitativa o qPCR. Para usar esta técnica es necesario añadir un colorante fluorescente que se intercale en la doble hebra de ADN, y la emisión de fluorescencia ser medida al final de cada ronda de amplificación. La medida en que esté presente un alelo de resistencia en la cantidad de ADN inicial determinará cuántos ciclos de qPCR se necesitan antes de que la fluorescencia supere el umbral de detección; es decir, si el alelo resistente está presente en la población en una proporción alta, el número de ciclos será menor. La qPCR se ha empleado para detectar y cuantificar alelos resistentes para el cambio G143A para los fungicidas QoI en *A. solani* (Rosenzweig et al. 2008a), *B. graminis* f. sp. *tritici* (Dodhia et al. 2021; Fraaije et al. 2002), *V. inaequalis* (Turan et al. 2016) y *Zymoseptoria tritici* (Fraaije et al. 2014); las mutaciones A495T e Y136F para los fungicidas DMI en *E. necator* y *B. graminis* f. sp. *tritici*,

respectivamente (Pintye et al. 2020; Yan et al. 2009); o las mutaciones F129L y E198A, para los fungicidas MBC, en *A. solani* (Rosenzweig et al. 2008a, 2008b) y en *M. fruticola* (Luo et al. 2007), respectivamente.

Esta técnica también ha sido empleada en combinación con la PCR específica de alelo (AS-PCR) para la detección cuantitativa de diferentes genotipos resistentes a los fungicidas QoI (Fraaije et al. 2002; Hashimoto et al. 2014), MBC (Chen et al. 2009) y SDHI (De Miccolis Angelini et al. 2014).

4.2.5. Detección mediante LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*).

Existen algunas ADN polimerasas, como la *Bst* polimerasa, que son capaces de separar la doble hebra de ADN y comenzar la amplificación a una temperatura constante en un proceso conocido como amplificación mediante desplazamiento de cadena. Esta propiedad fue usada por algunos investigadores japoneses para desarrollar una alternativa a la PCR conocida como *Loop-Mediated Isothermal Amplification* o LAMP (Notomi et al. 2000; Tomita et al. 2008). Esta técnica combina el uso de la *Bst* polimerasa y dos parejas de cebadores, dos internos y dos externos, que hibridan con seis regiones del ADN diana. Este diseño de cebadores permite que el ADN amplificado genere bucles que poseen extremos 3' libres donde se pueda empezar otro ciclo de amplificación de forma simultánea. El LAMP genera amplicones más rápidamente que la PCR y requiere un menor tiempo de reacción al realizarse a una temperatura constante y no requerir de ciclos. Esto permite llevarlo a cabo en baños a temperatura constante eliminando la necesidad de equipamientos sofisticados. Además, los resultados se pueden visualizar tanto en un gel de agarosa como directamente en el tubo usado en la amplificación mediante turbidez, cambio de color o medida de fluorescencia (Mori et al. 2001; Tomita et al. 2008; Goto et al. 2009; Zhang et al. 2012; Lee, 2013). Debido a su facilidad de uso, esta técnica ha sido ampliamente usada para la detección de alelos resistentes en estudios de resistencias a diversos fungicidas en numerosos hongos fitopatógenos (Duan et al. 2016; Chen et al. 2018; Fan et al. 2018; Wu et al. 2019; Zhu et al. 2020;)

4.2.6. Detección mediante dPCR (*Digital PCR*).

La PCR digital se emplea para la cuantificación de alelos mutados presentes en la población en muy baja proporción. La reacción de la PCR digital se basa en los mismos principios que la PCR cuantitativa, pero la muestra es procesada de manera diferente. En la PCR digital la muestra es diluida y colocada en una placa con pocillos, de tal manera que estadísticamente sólo puede haber una o ninguna molécula en cada uno. La reacción y la medida de la

II. INTRODUCCIÓN

fluorescencia se realiza de manera individual, por lo que no se necesitan curvas de estandarización para analizar posteriormente los resultados. Basándose en la distribución de Poisson, el número de compartimentos que presenten fluorescencia permitirán el cálculo del número de copias del alelo de interés presente en la muestra (Sykes et al. 1992). Esta técnica ha sido empleada para cuantificar la presencia de los cambios Y136F y S509T en el gen *cyp51* de *B. graminis* f. sp. *hordei*, responsables de la resistencia a los fungicidas DMI (Zulak et al. 2018) y el cambio G143A en *cytb* implicado en la resistencia a fungicidas QoI en *E. necator* (Miles et al. 2020).

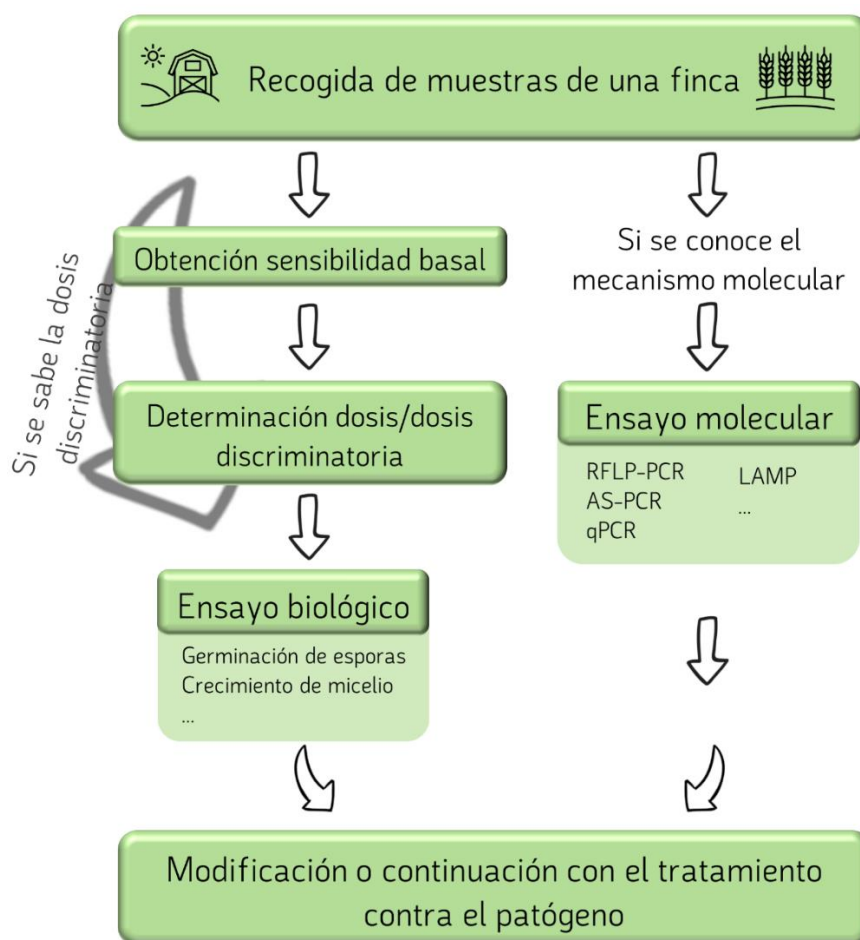


Figura II.7. Estrategias de monitorización de resistencias a fungicidas. Si no se conoce el mecanismo molecular o no se puede realizar de esta manera por otros motivos, en el caso de que no se conozca la dosis discriminatoria, primero se obtendría la sensibilidad basal del patógeno al fungicida y después de determinar una o varias dosis discriminatorias. En el caso de que estos ensayos se hubieran realizado previamente, se podría realizar directamente el ensayo biológico. Si el mecanismo molecular es conocido, se podría realizar un ensayo molecular para detectar y cuantificar la mutación responsable de la resistencia. Con los datos de ambos ensayos se cuantificarían los niveles de resistencia y se modificaría, si es el caso, el programa de aplicaciones de fungicidas que se estuviera realizando.

5. Referencias.

Acevedo-Garcia J, Spencer D, Thieron H, Reinstädler A, Hammond-Kosack K, Phillips AL, Panstruga R. 2017. Mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant Biotechnology Journal*. 15:367–378.

Álvarez B. 1993. Epidemiología de *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. Ex Fr.) Poll. en melón. Tesis Doctoral. Málaga: Universidad de Málaga.

Álvarez B, Torés JA. 1997. Cultivo *in vitro* de *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. Ex Fr.), efecto de diferentes fuentes de carbono sobre su desarrollo. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*. 23:283-288.

Amiri A, Heath SM, Peres NA. 2014. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. *Plant Disease*. 98:532–539.

Amrani L, Corio-Costet MF. 2006. A single nucleotide polymorphism in the beta tubulin gene distinguishing two genotypes of *Erysiphe necator* expressing different symptoms on grapevine. *Plant Pathology*. 55:505–512.

Anke T, Oberwinkler F, Steglich W, Schramm G. 1977. The strobilurins-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *Journal of Antibiotics*. 30:806-810.

Avenot HF, Sellam A, Karaoglanidis G, Michailides TJ. 2008. Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of Succinate Dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. *Phytopathology*. 98:736–742.

Avenot HF, Sellam A, Michailides TJ. 2009. Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. *Plant Pathology*. 58:1134–1143.

Avenot HF, Thomas A, Gitaitis RD, Langston DB Jr, Stevenson KL. 2012. Molecular characterization of boscalid- and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram. *Pest Management Science*. 68:645–651.

II. INTRODUCCIÓN

Avenot HF, van den Biggelaar H, Morgan DP, Moral J, Joosten M, Michailides TJ. 2014. Sensitivities of baseline isolates and boscalid-resistant mutants of *Alternaria alternata* from pistachio to fluopyram, penthiopyrad, and fluxapyroxad. *Plant Disease*. 98:197–205.

Avenot HF, Quattrini J, Puckett R, Michailides TJ. 2018. Different levels of resistance to cyprodinil and iprodione and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates collected from pistachio, grape, and pomegranate fields in California. *Crop Protection*. 112:274-281.

Avenot HF, Luna M, Michailides TJ. 2019. Phenotypic and molecular characterization of resistance to the SDHI fungicide fluopyram in populations of *Alternaria alternata* from pistachio orchards in California. *Crop Protection*. 124:104838.

Averre CW, Wehner TC. 1996. Field identification of selected cucurbit diseases with a hand lens. En: Zitter TA, Hopkins DL, C. E. Thomas, editores. *Compendium of cucurbit diseases*. Minnesota, Estados Unidos: APS Press. p. 76–78.

Junta de Andalucía. 2022. Balances Anuales de la Red de Alerta e Información Fitosanitaria de Andalucía [citado el 27/04/2022] Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/-agriculturapescajdesarrollorural/raif/balances-fitosanitarios>

Balba H. 2007. Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health*. 42:441-451.

Bardin M, Carlier J, Nicot PC. 1999. Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichoracearum*, a causal agent of powdery mildew of cucurbits. *Plant Pathology*, 48:531-540.

Bäumler S, Sierotzki H, Gisi U, Mohler V, Felsenstein FG, Schwarz G. 2003. Evaluation of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates for resistance to strobilurin fungicides with different SNP detection systems. *Pest Management Science*. 59:310–314.

Becker WF, von Jagow G, Anke T, Steglich W. 1981. Oudemansin, strobilurin a, strobilurin b, and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an e- β -methoxy-acrylate system as common structural element. *FEBS Letters*. 132:329-333.

Beckerman, J. 2018. Fungicide mobility for nursery, greenhouse, and landscape professionals. *Disease Management Strategies for Horticultural Crops*. BP-70-W.

II. INTRODUCCIÓN

Bélanger RR, Dik AJ, Menzies JG, 1998. Powdery mildews. Recent advances toward integrated control. En: Boland GJ, Kuykendall LD, editores. Plant-Microbe Interactions and Biological Control. Nueva York, EEUU. p. 89-109.

Bellón-Gómez D, Vela-Corcía D, Pérez-García A, Torés JA. 2014. Sensitivity of *Podosphaera xanthii* populations to anti-powdery-mildew fungicides in Spain. Pest Management Science. 71:1407–1413.

Bennett FGA. 1984. Resistance to powdery mildew in wheat: A review of its use in agriculture and breeding programmes. Plant Pathology. 33:279–300.

Billard A, Fillinger S, Leroux P, Lachaise H, Beffa R, Debieu D. 2012. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic isolates. Pest Management Science. 68:684–691.

Braun U, Cook RTA, Inman AJ, Shin HD. 2001. The taxonomy of the powdery mildew fungi. En: Richard R, Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, editores. The Powdery Mildews: A Comprehensive Treat. 1º edición. Minnesota, EEUU: American Phytopathological Society (APS Press). p. 13-55.

Brent KJ. 1985. Detection and monitoring of resistant forms: an overview. En: Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. Washington DC, Estados Unidos: National Academy Press. p. 298-312.

Brent KJ. 1989. Fungicide resistance in crops: its practical significance and management. En: Brent KJ, Atkin RK, editores. Rational Pesticide Use. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press. p. 137-152.

Brent KJ, Hollomon D. 2007. Fungicide Resistance in Crop Pathogens. How Can It Be Managed? 2ª edición. Bruselas, Bélgica: FRAC.

European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2015. PP 1/213 (4) Resistance risk analysis. EPPO Bulletin. 45:371–387.

Carroll JE, Wilcox WF. 2003. Effects of humidity on the development of grapevine powdery mildew. Phytopathology. 93:1137–1144.

II. INTRODUCCIÓN

Carter HE, Cools HJ, West JS, Shaw MW, Fraaije BA. 2013. Detection and molecular characterisation of *Pyrenopeziza brassicae* isolates resistant to methyl benzimidazole carbamates. *Pest Management Science*. 69:1040–1048.

Chen W-J, Delmotte F, Cervera SR, Douence L, Greif C, Corio-Costet M-F. 2007. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:5162–5172.

Chen C, Zhao W, Lu Y, Wang J, Chen Y, Li H, Zhou M. 2009. High-throughput detection of highly benzimidazole-resistant allele E198A with mismatch primers in allele-specific real-time polymerase chain reaction. *Pest Management Science*. 65:413–419.

Chen S, Schnabel G, Yuan H, Chaoxi L. 2018. LAMP detection of the genetic element “Mona” associated with DMI resistance in *Monilinia fructicola*. *Pest Management Science*. 75:779-786.

Cohen R, Burger AY, Katzir N, 2004. Monitoring physiological races of *Podosphaera xanthii* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*), the causal agent of powdery mildew in cucurbits: Factors affecting race identification and the importance for research and commerce. *Phytoparasitica*. 32:174-183.

Cools HJ, Fraaije BA, Lucas JA. 2005. Molecular examination of *Septoria tritici* isolates with reduced sensitivities to triazoles. En: Dehne HW, Gisi U, Kuck K-H, Russel PE, Lyr H, editores. *Modern Fungicides and Antifungal Compound IV*. Alton, Reino Unido: BCPC. p. 103-114.

Corio-Costet MF, Dufour MC, Cigna J, Abadie P, Chen W-J. 2011. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology*. 129:315-329.

Corio-Costet MF. 2015. Monitoring resistance in obligate pathogens by bioassays relating to field use: grapevine powdery and downy mildews. En: *Fungicide resistance in plant pathogens*. Tokio, Japón: Springer. p. 251-279.

Cowger C, Parka R, Marshall O. 2009. Appearance of powdery mildew of wheat caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* on Pm17-bearing cultivars in North Carolina. *Plant Disease*. 93:1219.

Damicone J. 2014. Fungicide resistance management. Oklahoma Cooperative Extension Service.

II. INTRODUCCIÓN

Davidse LC. 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology*. 24:43-65.

De Miccolis Angelini RM, Masiello M, Rotolo C, Pollastro S, Faretra F. 2014. Molecular characterisation and detection of resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science*. 70:1884–1893.

Del Pino D, Olalla L, Pérez-García A, Rivera ME, García S, Moreno R, de Vicente A, Torés JA. 2002. Occurrence of races and pathotypes of cucurbit powdery mildew in southeastern Spain. *Phytoparasitica*. 30:459–466.

Delp CJ. 1954. Effects of temperature and humidity on the grape powdery mildew fungus. *Phytopathology*. 44:615–626.

Délye C, Laigret F, Corio-Costet MF. 1997a. RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathology*. 87:670–677.

Délye C, Laigret F, Corio-Costet MF. 1997b. A mutation in the 14 alpha-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied Environment Microbiology*. 63:2966-2970.

Délye C, Bousset L, Corio-Costet MF. 1998. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14a-demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a “recalcitrant” fungus. *Current genetics*. 34:399-403.

Dodhia KN, Cox BA, Oliver RP, López-Ruiz FJ. 2021. Rapid in situ quantification of the strobilurin resistance mutation G143A in the wheat pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Scientific Reports*. 11:4526.

Duan Y, Yang Y, Li T, Zhao D, Cao J, Shi Y, Wang J, Zhou, M. 2016. Development of a rapid and high-throughput molecular method for detecting the F200Y mutant genotype in benzimidazole-resistant isolates of *Fusarium asiaticum*. *Pest Management Science*. 72:2128–2135.

Ehlers RU. 2011. Regulation of biological control agents and the EU policy support action REBECA. En: *Regulation of biological control agents*. Dordrecht, Países Bajos: Springer. p. 3-23.

II. INTRODUCCIÓN

Eichmann R, Hückelhoven R. 2008. Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *Journal Plant Physiology*. 165:5–18.

Esser L, Quinn B, Li YF, Zhang M, Elberry M, Yu L, Yu CA, Xia D. 2004. Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome bc1 complex. *Journal of Molecular Biology*. 341:281-302.

Fan F, Yin WX, Li GQ, Lin Y, Luo CX. 2018. Development of a LAMP method for detecting SDHI fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. 102:1612–1618.

FAOSTAT. 2021. Valor de la producción agrícola [citado el 26 abril 2022] Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QV>

Fedorina J, Tikhonova N, Ukhatova Y, Ivanov R, Khlestkina E. 2022. Grapevine gene systems for resistance to gray mold *Botrytis cinerea* and powdery mildew *Erysiphe necator*. *Agronomy*. 12:499.

Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, López-Ruiz F, Romero D, de Vicente A, Torés JA. 2006. Occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 115:215–222.

Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Internacional Microbiol.* 11:1–9.

Fernández-Ortuño D, Chen F, Schnabel G. 2012. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Disease*. 96:1198-1203.

Fraaije BA, Butters JA, Coelho JM, Jones DR, Hollomon DW. 2002. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathology*. 51:45–54.

Fraaije BA, Atkins S, Luo J, Diez De La Fuente P, Hawkins NJ. 2014. Evolution and spread of azole-insensitive *Zymoseptoria tritici* field isolates in the UK. *Phytopathology*, 104:S3.

FRAC. 2022. Pathogen Risk List. [citado el 21 abril 2022]. Disponible en: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf?sfvrsn=caf3489a_2.

II. INTRODUCCIÓN

Fukino N, Yoshioka Y, Sugiyama M, Sakata Y, Matsumoto S. 2013. Identification and validation of powdery mildew (*Podosphaera xanthii*)-resistant loci in recombinant inbred lines of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Molecular breeding*. 32:267-277.

Gacek E. 1983. Analiza patogeniczności grzybów porażających jęczmienia. *Biuletyn IHAR*, 150: 11–15.

Gadoury DM, Pearson RC. 1990. Ascocarp dehiscence and ascospore dis-charge in *Uncinula necator*. *Phytopathology*. 80:393–401.

Gadoury DM, Cadle-Davidson L, Wilcox WF, Dry IB, Seem RC, Milgroom MG. 2012. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular plant pathology*. 13:1-16.

Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I, Sabatti M. 2009. Allele-specific PCR in SNP genotyping. In: *Single nucleotide polymorphisms*. Nueva Jersey, Estados Unidos: Humana Press. p. 415-424.

Georgopapadakou NH, Walsh TJ. 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40:279-291.

Gisi U, Schaub F, Wiedmer H, Ummel E. 1986. SAN 619F, a new triazole fungicide. In: *Proceedings of the British Crop Protection Conference 1986 – Pests and Diseases*, Vol. 1. Farnham, Reino Unido: British Crop Protection Council. p. 33–40.

Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*. 58:859-867.

Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I. 2009. Colorimetric detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification reaction by using hydroxynaphthol blue. *BioTechniques*. 46:167–172.

Götz M, Friedrich S, Boyle C. 1996. Development of cleistothecia and early ascospore release of *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* in winter wheat in relation to host age and climatic conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 103:134–141.

Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A, Gisi, U. 2006. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science*. 62:465-472.

II. INTRODUCCIÓN

- Guo J, Li Y, He C, Yan Y, Yu X. 2019. Establishing a high-efficiency regeneration system in pumpkin (*Cucurbita moschata*). Chinese Bulletin of Botany. 54:539.
- Gur L, Reuveni M, Cohen Y, Cadle-Davidson L, Kisselstein B, Ovadia S, Frenkel O. 2021. Population structure of *Erysiphe necator* on domesticated and wild vines in the Middle East raises questions on the origin of the grapevine powdery mildew pathogen. Environmental Microbiology. 23:6019-6037.
- Hägerhäll C. 1997. Succinate: quinone oxidoreductases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. 1320:107–141.
- Hashimoto M, Aoki Y, Saito S, Suzuki S. 2014. Characterisation of heteroplasmic status at codon 143 of the *Botrytis cinerea* cytochrome b gene in a semi-quantitative AS-PCR assay. Pest Management Science. 71:467–477.
- Hawkins NJ, Fraaije BA. 2016. Predicting resistance by mutagenesis: Lessons from 45 Years of MBC resistance. Frontiers in Microbiology. 7:1814.
- Heffer V, Johnson KB, Powelson ML, Shishkoff N. 2006. Identification of powdery mildew fungi anno 2006. The Plant Health Instructor.
- Hermann D, Stenzel K. 2019. FRAC mode-of-action classification and resistance risk of fungicides. Modern Crop Protection Compounds. 2:589-608.
- Hermansen J, Torp U, Prahm L. 1978. Studies of transport of live spores of cereal mildew and rust fungi across the North Sea. Grana. 17:41–46.
- Hippe S. 1991. Influence of fungicides on fungal fine structure. En: Mendgen K, Lesemann DE, editores. Electron microscopy of plant pathogens. Berlin, Alemania: Springer. p. 317-331.
- Hirose S, Tanda S, Kiss L, Grigaliunaite B, Havrylenko M, Takamatsu S. 2005. Molecular phylogeny and evolution of the maple powdery mildew (*Sawadaea*, *Erysiphaceae*) inferred from nuclear rDNA sequences. Mycological Research. 109:912–922.
- Horsefield R, Iwata S, Byrne B. 2004. Complex II from a structural perspective. Current Protein and Peptide Science. 5:107-118.

II. INTRODUCCIÓN

- Hu M-J, Fernández-Ortuño D, Schnabel G. 2016. Monitoring resistance to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea* from strawberry fields. *Plant Disease*. 100:959–965.
- Hu J, Deng S, Gao T, Lamour K, Liu X, Ren H. 2018. Thiophanate-methyl resistance in *Sclerotinia homoeocarpa* from golf courses in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 152:84-89.
- Hückelhoven R. 2005. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiology Letters*. 245:9-17.
- Ishii H, Fraaije BA, Sugiyama T, Noguchi K, Nishimura K, Takeda T, Amano T, Hollomon DW. 2001. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*. 91:1166-1171.
- Ishii H, Hollomon DW. 2015. Fungicide resistance in plant pathogens. Tokio, Japón: Springer.
- Jahn M, Munger HM, McCreight JD, 2002. Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. En: Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, editores. *The Powdery Mildews. A comprehensive treatise*. Minnesota, Estados Unidos: APS Press. p. 239-248.
- Jiang J, Ding L, Michailides TJ, Li H, Ma Z. 2009. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 93:72–76.
- Jorgensen JH. 1972. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*. 63:141–152.
- Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. 2022. Avance de superficies y producciones [citado el 21 abril 2022]. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/servicios/estadistica-cartografia/estadisticas-agricolas/paginas/avance-superficie-producciones-agricolas.html>
- Koenraadt H, Jones AL. 1992. The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*. 82:1354-1358.

II. INTRODUCCIÓN

Kunova A, Pizzatti C, Saracchi M, Pasquali M, Cortesi P. 2021. Grapevine powdery mildew: fungicides for its management and advances in molecular detection of markers associated with resistance. *Microorganisms*. 9:1541.

Lamb D, Kelly D, Kelly S. 1999. Molecular aspects of azole antifungal action and resistance. *Drug Resistance Updates*. 2:390-402.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic acids research*. 21:3761-3766.

Lee NY. 2013. Recent progress in lab-on-a-chip technology and its potential application to clinical diagnoses. *International Neurourology Journal*. 17:2-10.

Leroux P, Gredt M, Leroch M, Walker AS. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strain of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:6615-6630.

Lesemann SS, Schimpke S, Dunemann F, Deising HB. 2006. Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome b gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. y Ev.) E.S. Salmon. *Journal of Plant Disease*. 113:259-266.

Li JS, Wu LY, Zhang H, Song XS, Wang JX, Zhou M, Hou Y. 2020. PCR-RFLP for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with resistance to phenamacril. *Plant Disease*. 105:889-895.

Lichtemberg PSF, Luo Y, Doussoulin H, Michailides TJ. 2018. Using Allele-Specific PCR for detecting multiple amino acid substitutions associated with SDHI resistance in *Alternaria alternata* causing Alternaria late blight in pistachio. *Letters in Applied Microbiology*. 67:506-512.

López-Ruiz FJ, Pérez-García A, Fernández-Ortuño D, Romero D, García E, de Vicente A, Brown JK, Torés JA. 2010. Sensitivities to DMI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. *Pest Management Science*. 66:801-808.

Lucas JA. 2017. Resistance Management: We know why but do we know how? En: Deising HB, Fraaije B, Mehl A, Oerke EC, Sierotzki H, Stammler G, editores. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. Braunschweig, Alemania: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft. p.3-14.

II. INTRODUCCIÓN

Luo Y, Ma Z, Michailides TJ. 2007. Quantification of allele E198A in beta-tubulin conferring benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* using real-time PCR. Pest Management Science. 63:1178–1184.

Luo CX, Cox KD, Amiri A, Schnabel G. 2008. Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element “Mona” in *Monilinia fructicola*. Plant Disease. 92:1099–1103.

Luo QQ, Xu JQ, Hou YP, Chen CJ, Wang JX, Zhou MG. 2009. PIRA-PCR for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with moderate resistance to carbendazim. Plant Pathology. 58:882-887.

Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. Trends In Molecular Medicine. 8:76-81.

Lyngkjaer MF, Newton AC, Atzema JL, Baker SJ. 2000. The barley mlo-gene: An important powdery mildew resistance source. Agronomie. 20:745–756.

Mallik I, Arabiat S, Pasche JS, Bolton MD, Patel JS, Gudmestad NC. 2014. Molecular characterization and detection of mutations associated with resistance to succinate dehydrogenase-inhibiting fungicides in *Alternaria solani*. Phytopathology. 104:40-49.

McCreight JD. 2006. Melon-Powdery Mildew Interactions Reveal Variation in Melon Cultigens and *Podosphaera xanthii* Races 1 and 2. Journal of the American Society for Horticultural Science. 131:59–65.

McDonald BA, Linde C. 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. Euphytica. 124:163-180.

Miazzi M, Hajjeh H, Faretra F. 2003. Observations on the population biology of the grape powdery mildew fungus *Uncinula necator*. Journal of Plant Pathology. 85:123–129.

Miazzi M, Hajjeh H, Faretra F. 2008. Occurrence and distribution of two distinct genetic groups in populations of *Erysiphe necator* Schw. in southern Italy. Journal of Plant Pathology. 90:563–573.

Mikaberidze A, Paveley N, Bonhoeffer S, van den Bosch F. 2017. Emergence of resistance to fungicides: The role of fungicide dose. Phytopathology. 107:545-560.

II. INTRODUCCIÓN

Miles TD, Neill T, Colle M, Warneke B, Robinson G, Stergiopoulos I, Mahaffee WF. 2020. Allele-specific detection methods for QoI fungicide resistant *Erysiphe necator* in vineyards. *Plant Disease*. 105:175-182.

Montarry J, Cartolaro P, Delmotte F, Jolivet J, Willocquet L. 2008. Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during grape-vine powdery mildew epidemics. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:6327–6332.

Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. 2001. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 289:150–154.

Morton V, Staub T. 2008. A short history of fungicides. *APSnet Features*. 308.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2022. Taxonomy [citado el 26 abril 2022] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>

Niewoehner AS, Leath SN. 1998. Virulence of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* on winter wheat in the Eastern United States. *Plant Disease*. 82:64–68.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28:e63.

Nunes EWLP, Esteras C, Ricarte AO, Martínez-Perez E, Gómez-Guillamón ML, Nunes GHS, Picó MB. 2017. Brazilian melon landraces resistant to *Podosphaera xanthii* are unique germplasm resources. *Annals of Applied Biology*. 171:214–228.

Núñez Y, Gallego J, Ponz F, Raposo R. 2006. Analysis of population structure of *Erysiphe necator* using AFLP markers. *Plant Pathology*. 55:650–656

Oliver R, Hewitt HG. 2014. Fungicide performance. En: *Fungicides in crop protection*. 2ª edición. Oxfordshire, Reino Unido: CABI. p. 72-73

Parks R, Carbone I, Murphy JP, Marshall D, Cowger C. 2008. Virulence structure of the Eastern U.S. wheat powdery mildew population. *Plant Disease*. 92:1074–1082.

Paulitz TC, Bélanger RR. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*. 39:103-133.

II. INTRODUCCIÓN

Pearson RC, Gadoury DM. 1987. Cleistothecia, the source of primary inoculum for grape powdery mildew in New York. *Phytopathology*. 77:1509–1514

Pearson RC, Gadoury DM. 1992. Grape powdery mildew. En: Kumar J, Chaube HS, Singh US, Mukhopadhyay AN, editores. *Plant Diseases of International Importance*, Vol. III. Diseases of Fruit Crops. Nueva Jersey, EEUU: Prentice Hall. p. 129–146.

Pérez-García A, Romero D, Fernández-Ortuño D, López-Ruiz F, de Vicente A, Torés JA. 2009. The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits. *Molecular Plant Pathology*. 10:153–160.

Péros JP, Troulet C, Guerriero M, Michel-Romiti C, Notteghem JL. 2005. Genetic variation and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, in southern France. *European Journal of Plant Pathology*. 113:407–416.

Pietrusińska A, Tratwal A. 2020. Characteristics of powdery mildew and its importance for wheat grown in Poland. *Plant Protection Science*. 56:141-153.

Pintye A, Nemeth MZ, Molnar O, Horvath AN, Spitzmüller Z, Szaloki N, Pál K, Váczy KZ, Kovacs GM. 2020. Improved DNA extraction and quantitative real-time PCR for genotyping *Erysiphe necator* and detecting the DMI fungicide resistance marker A495T, using single ascocarps. *Phytopathologia Mediterranea*. 59:97-106.

Pirondi A, Nanni IM, Brunelli A, Collina M. 2014. First report of resistance to cyflufenamid in *Podosphaera xanthii*, causal agent of powdery mildew, from melon and zucchini fields in Italy. *Plant Disease*. 98:1581–1581.

Pirondi A, Vela-Corcía D, Dondini L, Brunelli A, Pérez-García A, Collina M. 2015. Genetic diversity analysis of the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera xanthii* suggests a clonal population structure. *Fungal Biology*. 119:791–801.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2022. Registro de Productos Fitosanitarios [citado el 26 abril 2022] Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>

Rehfus A, Miessner S, Achenbach J, Strobel D, Bryson R, Stammeler G. 2016. Emergence of succinate dehydrogenase inhibitor resistance of *Pyrenophora teres* in Europe. *Pest Management Science*. 72:1977–1988.

II. INTRODUCCIÓN

Ridout, CJ. 2009. Profiles in pathogenesis and mutualism: Powdery mildews. En: Deising, HB, editor. Plant Relationships. The Mycota. vol 5. Berlin, Alemania: Springer. p. 51-68.

Rienth M, Vigneron N, Walker RP, Castellarin SD, Sweetman C, Burbidge CA, Bonghi C, Famiani F, Darriet P. 2021. Modifications of grapevine berry composition induced by main viral and fungal pathogens in a climate change scenario. *Frontiers in Plant Science*. 12:717223.

Rosenzweig N, Atallah ZK, Olaya G, Stevenson WR. 2008a. Evaluation of QoI fungicide application strategies for managing fungicide resistance and potato early blight epidemics in Wisconsin. *Plant Disease*. 92:561–568.

Rosenzweig N, Olaya G, Atallah ZK, Cleere S, Stanger C, Stevenson WR. 2008b. Monitoring and tracking changes in sensitivity to azoxystrobin fungicide in *Alternaria solani* in Wisconsin. *Plant Disease*. 92:555–560.

Rosenzweig N, Hanson LE, Clark G, Franc GD, Stump WL, Jiang QW, Stewart J, Kirk WW. 2015. Use of PCR-RFLP analysis to monitor fungicide resistance in *Cercospora beticola* populations from sugarbeet (*Beta vulgaris*) in Michigan, United States. *Plant Disease*. 99:355–362.

Ruprecht J, Yankovskaya V, Maklashina E, Iwata S, Cecchini G. 2009. Structure of Escherichia coli succinate: quinone oxidoreductase with an occupied and empty quinone-binding site. *Journal of Biological Chemistry*. 284:29836-29846.

Russell PE. 2006. Fungicide resistance action committee (FRAC): a resistance activity update. *Outlooks on Pest Management*. 17:119-121.

Saharan GS, Mehta, N.K, Meena, P.D. 2019. Infection, pathogenesis and disease cycle. En: Saharan GS, Mehta NK, Meena PD, editores, Powdery Mildew Disease of Crucifers: Biology, Ecology and Disease Management. Singapur: Springer. p. 95–130.

Saito S, Suzuki S, Takayanagi T. 2009. Nested PCR-RFLP is a high-speed method to detect fungicide-resistant *Botrytis cinerea* at an early growth stage of grapes. *Pest Management Science*. 65:197–204.

Sambrook J. 1989. *In vitro* amplification of DNA by the polymerase chain reaction. En: Molecular cloning. A laboratory manual. Nueva York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

II. INTRODUCCIÓN

Sanglard D. 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology*. 5:379-385.

Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. 2003. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:2404-2412.

Schnabel G, Jones AL. 2001. The 14 α -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology*. 91:102-110.

Schnabel G, Hu MJ, Fernández-Ortuño D. 2015. Monitoring resistance by bioassay: relating results to field use using culturing methods. En: *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Tokio, Japón: Springer. p. 281-293.

Shanmugasundaram S, Williams PH, Peterson CE. 1971. Inheritance of resistance to powdery mildew in cucumber. *Phytopathology*. 61:1218-1221.

Shaw MW. 2006. Is there such a thing as a fungicide resistance strategy? A modeller's perspective. *Aspects of Applied Biology*. 78:37-43.

Sidhu GS. 1988. Genetics of plant pathogenic fungi. En: Ingram DS, Williams PH, editores. *Advances in Plant Pathology*, volumen 2. Cambridge, Estados Unidos: Academic Press.

Sierotzki H, Frey R, Wullschlegel J, Palermo S, Karlin S, Godwin J, Gisi U. 2007. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Management Science*. 63:225-233.

Sierotzki H. 2015. Respiration inhibitors: complex III. En: *Fungicide resistance in plant pathogens*. Tokio, Japón: Springer. p. 119-143.

Simeone R, Piarulli L, Nigro D, Signorile MA, Blanco E, Mangini G, Blanco A. 2020. Mapping powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) resistance in wild and cultivated tetraploid wheats. *International Journal of Molecular Sciences*. 21:7910.

Stammler G, Carstensen M, Koch A, Semar M, Strobel D, Schlehuber S. 2008. Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and-field efficacy. *Crop Protection*. 27:1448-1456.

II. INTRODUCCIÓN

Standish JR, Tomaso-Peterson M, Allen TW, Sabanadzovic S, Aboughanem-Sabanadzovic N. 2015. Occurrence of QoI fungicide resistance in *Cercospora soja* from Mississippi soybean. Plant Disease. 99:1347–1352.

Stefano GB, Bjenning C, Wang F, Wang N, Kream RM. 2017. Mitochondrial heteroplasmy. En: Santulli, G, editor. Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine. Suiza: Springer. p. 577-594.

Steffens JJ, Pell EJ, Tien M. 1996. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. Current Opinion in biotechnology. 7:348-355.

Stergiopoulos I, De Waard MA. 2002. Activity of azole fungicides and ABC transporter modulators on *Mycosphaerella graminicola*. Journal of Phytopathology. 150:313-320.

Stergiopoulos I, Van Nistelrooy JG, Kema GH, De Waard MA. 2003. Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. Pest Management Science. 59:1333-1343.

Stummer BE, Zanker T, Scott ES, Whisson DL. 2000. Genetic diversity in populations of *Ucinula necator*: comparison of RFLP- and PCR-based approaches. Mycological Research 104:44–52.

Summer RW, Brown JKM. 2013. Constraints on breeding for disease resistance in commercially competitive wheat cultivars. Plant Pathology. 62:115–121.

Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. 1992. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. Biotechniques. 13:444-449.

Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. 2008. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nature Protocols. 3:877–882.

Troch V, Audenaert K, Bekaert B, Höfte M, Haesaert G. 2012. Phylogeography and virulence structure of the powdery mildew population on its 'new' host triticale. BMC Evolutionary Biology. 12: 76.

Tucker SL, Talbot NJ. 2002. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology. 39, 385–417.

II. INTRODUCCIÓN

- Turan C, Nanni IM, Tosun NECİP, Collina M. 2016. First report of QoI resistance in *Venturia inaequalis* causing apple scab in apple orchards in Turkey. *Plant Disease*. 100:1016-1016.
- Ulrich JT, Mathre D. 1972. Mode of action of oxathiin systemic fungicides V. Effect on electron transport system of *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 110:628-632.
- van den Bosch F, Oliver R, van den Berg F, Paveley N. 2014 Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. *Annual Review of Phytopathology*. 52:175-195.
- Varallyay E, Giczey G, Burgyan J. 2012. Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. *Archives of Virology*. 157:1345–1350.
- Vela-Corcía D, Bellón-Gómez D, López-Ruiz F, Torés JA, Pérez-García A. 2014. The *Podosphaera fusca* TUB2 gene, a molecular “Swiss Army knife” with multiple applications in powdery mildew research. *Fungal Biology*. 118:228–241.
- Veloukas T, Leroch M, Hahn M, Karaoglanidis GS. 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease*. 95:1302-1307.
- Viennot-Bourgin G. 1985. Rapport pour l'attribution du Prix de Coincy en 1984. *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques*. 132:79-80.
- Villani SM, Cox KD. 2014. Heteroplasmy of the cytochrome b Gene in *Venturia inaequalis* and its involvement in quantitative and practical resistance to trifloxystrobin. *Phytopathology*. 104:945–953.
- Wade M. 1988. Strategies for preventing or delaying the onset of resistance to fungicides and for managing resistance occurrences. En: Delp CJ, editor. *Fungicide resistance in North America*. St. Paul, Estados Unidos: APS Press. p. 14–15.
- Walker A, Bouguennec A, Confais J, Morgant G, Leroux P. 2011. Evidence of host-range expansion from new powdery mildew (*Blumeria graminis*) infections of triticales (× *Triticosecale*) in France. *The Plant Pathology Journal*. 60:207–220.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*. 32:947–951.

II. INTRODUCCIÓN

Wang F, Saito S, Michailides T, Xiao, CL. 2021. Fungicide resistance in *Alternaria alternata* from blueberry in California and its impact on control of Alternaria rot. Plant Disease. 6:PDIS09211971RE.

Weber RWS, Hahn M. 2011. A rapid and simple method for determining fungicide resistance in Botrytis. Journal of Plant Diseases and Protection. 118:17–25.

Wu J, Hu X, Zhang C-Q. 2019. Molecular detection of QoI-resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing strawberry anthracnose based on Loop-Mediated Isothermal Amplification assay. Plant Disease. 103: 1319-1325.

Wyand RA, Brown JKM. 2005 Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. Fungal Genetics and Biology. 42:726-735.

Yan L, Yang Q, Zhou Y, Duan X, Ma Z. 2009. A real-time PCR assay for quantification of the Y136F allele in the CYP51 gene associated with *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* resistance to sterol demethylase inhibitors. Crop Protection. 28:376–380.

Yang JH, Brannen PM, Schnabel G. 2015. Resistance in *Alternaria alternata* to SDHI fungicides causes rare disease outbreak in peach orchards. Plant Disease. 99:65–70.

Yin Y, Liu X, Shi Z, Ma Z. 2010. A multiplex allele-specific PCR method for the detection of carbendazim-resistant *Sclerotinia sclerotiorum*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 97:36–42.

Yin YN, Kim YK, Xiao CL. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. Phytopathology. 101:986–995.

Yin YN, Xiao CL. 2013. Molecular characterization and a multiplex allele-specific PCR method for detection of thiabendazole resistance in *Penicillium expansum* from apple. European Journal of Plant Pathology. 136:703–713.

Young DH. 2015. Anti-tubulin agents. En: Ishii H, Hollomon, D, editores. Fungicide resistance in plant pathogens. Tokio, Japón: Springer. p. 93-103.

Zadoks J. 1967. International dispersal of funöi. Netherlands Journal of Plant Pathology. 73:61–80.

II. INTRODUCCIÓN

Zhan J, Stefanato FL, McDonald BA. 2006. Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and in response to host resistance. *Molecular Plant Pathology*. 7:259-268.

Zhang Y, Shan X, Shi L, Lu X, Tang S, Wang Y, Li Y, Alam MJ, Yan, H. 2012. Development of a fimY-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Salmonella* in food. *Food Research International*. 45:1011–1015.

Zhang H, Brankovics B, van der Lee TA, Waalwijk C, van Diepeningen AA, Xu J, Xu J, Chen W, Feng J. 2016. A single-nucleotide-polymorphism-based genotyping assay for simultaneous detection of different carbendazim-resistant genotypes in the *Fusarium graminearum* species complex. *PeerJ*. 4:e2609.

Zhu J, Zhang L, Li H, Gao Y, Mu W, Liu F. 2020. Development of a LAMP method for detecting the N75S mutant in SDHI-resistant *Corynespora cassiicola*. *Analytical Biochemistry*. 597:113687.

Zulak KG, Cox BA, Tucker MA, Oliver RP, López-Ruiz FJ. 2018. Improved detection and monitoring of fungicide resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* with high-throughput genotype quantification by digital PCR. *Frontiers in Microbiology*. 9:706.

III.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Dentro del territorio nacional, Almería concentra el 60% de la producción de hortalizas, la cual alcanzó los 6.5 millones de toneladas en 2019. Respecto al cultivo de cucurbitáceas, en Andalucía se produjeron más de 3 millones de toneladas de las cucurbitáceas económicamente más importantes (pepino, calabacín, sandía y melón), de los cuales más del 80 % fueron producidas únicamente en Almería (Analistas Económicos de Andalucía 2020). Sin embargo, y debido a los requerimientos de temperatura y humedad relativa necesarios para su cultivo, las cucurbitáceas son susceptibles a más de 200 enfermedades (Naqvi 2004; Gullino et al. 2020). Entre todas estas enfermedades destaca sobremanera el oídio causado por *P. xanthii* (Seebold 2010). Para intentar controlar esta enfermedad, los agricultores realizan un control integrado recurriendo a distintas estrategias; entre ellas, el control biológico y el empleo de cultivares resistentes, pero sobre todo el uso, a veces intensivo, de fungicidas. Hoy en día hay registradas 19 materias activas pertenecientes a 7 familias químicas diferentes (aril-fenil-cetonas, fenil-acetaminas, fungicidas DMI, fungicidas MBC, fungicidas QoI, fungicidas SDHI e hidroxil(2-amino-) pirimidinas), las cuales forman parte de distintas formulaciones comerciales (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2022). Sin embargo, *P. xanthii* está clasificado como un patógeno de alto riesgo (FRAC 2022), siendo capaz de desarrollar resistencia a estos compuestos en un corto periodo de tiempo. Estudios anteriores de monitorización de resistencia a fungicidas realizados en España han detectado poblaciones resistentes de *P. xanthii* a los fungicidas QoI, DMI y MBC (Fernández-Ortuño et al. 2006; López-Ruiz et al. 2010; Bellón-Gómez et al. 2015), lo que ilustra la dificultad de controlar este patógeno de una forma eficaz.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, en esta tesis doctoral se definieron los siguientes objetivos:

- 1. Realizar un estudio bibliográfico de la situación actual de resistencia a nivel mundial de los oídios a diferentes familias de fungicidas.**
- 2. Definir los niveles de resistencia a los fungicidas SDHI en *P. xanthii* en España y esclarecer los mecanismos moleculares de resistencia a estos fungicidas.**
- 3. Determinar si la heteroplasmia mitocondrial es la responsable de la resistencia a fungicidas QoI en *P. xanthii* en España.**
- 4. Diseñar técnicas moleculares para la detección y/o cuantificación de la resistencia a fungicidas MBC, QoI y SDHI en *P. xanthii*.**

Referencias.

Analistas Económicos de Andalucía. 2020. Informe Anual del Sector Agrario en Andalucía [citado el 26 abril 2022] Disponible en:

<https://www.analistaseconomicos.com/system/files/El%20Sector%20Agrario%20en%20Andaluc%C3%ADa%202020.pdf>

Naqvi SAMH. 2004. Diagnosis and management of certain important fungal diseases of citrus. En: Diseases of Fruits and Vegetables Volume I. Dordrecht, Países Bajos: Springer. p. 247-290.

Gullino ML, Albajes R, Nicot PC. 2020. Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Suiza: Springer. p. 691.

Seebold K, Coolong T. 2010. Cultivar evaluations and fungicide programs for managing powdery mildew on pumpkin. Fruit and Vegetable Research Report. p.40–42.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2022. Registro de Productos Fitosanitarios [citado el 26 abril 2022] Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>

FRAC. 2022. Pathogen Risk List. [citado el 21 abril 2022]. Disponible en: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf?sfvrsn=caf3489a_2.

Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, López-Ruiz F, Romero D, de Vicente A, Torés JA. 2006. Occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. European Journal of Plant Pathology. 115:215–222.

López-Ruiz FJ, Pérez-García A, Fernández-Ortuño D, Romero D, García E, de Vicente A, Brown JK, Torés JA. 2010. Sensitivities to DMI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. Pest Management Science. 66:801–808.

Bellón-Gómez D, Vela-Corcía D, Pérez-García A, Torés JA. 2014. Sensitivity of *Podosphaera xanthii* populations to anti-powdery-mildew fungicides in Spain. Pest Management Science. 71:1407–1413.

IV.

RESULTADOS

Artículo 1

Fungicide resistance in powdery mildew fungi.

Alejandra Vielba-Fernández, Álvaro Polonio, Laura Ruiz-Jiménez, Antonio de Vicente, Alejandro Pérez-García y Dolores Fernández-Ortuño.

Microorganisms, 2020. 8, 1431. doi:10.3390/microorganisms8091431

Abstract

Powdery mildew fungi (Erysiphales) are among the most common and important plant fungal pathogens. These fungi are obligate biotrophic parasites that attack nearly 10,000 species of angiosperms, including major crops, such as cereals and grapes. Although cultural and biological practices may reduce the risk of infection by powdery mildew, they do not provide sufficient protection. Therefore, in practice, chemical control, including the use of fungicides from multiple chemical groups, is the most effective tool for managing powdery mildew. Unfortunately, the risk of resistance development is high because typical spray programs include multiple applications per season. In addition, some of the most economically destructive species of powdery mildew fungi are considered to be high-risk pathogens and are able to develop resistance to several chemical classes within a few years. This situation has decreased the efficacy of the major fungicide classes, such as sterol demethylation inhibitors, quinone outside inhibitors and succinate dehydrogenase inhibitors, that are employed against powdery mildews. In this review, we present cases of reduction in sensitivity, development of resistance and failure of control by fungicides that have been or are being used to manage powdery mildew. In addition, the molecular mechanisms underlying resistance to fungicides are also outlined. Finally, a number of recommendations are provided to decrease the probability of resistance development when fungicides are employed.

Artículo 2

Resistance to the SDHI Fungicides Boscalid and Fluopyram in *Podosphaera xanthii* Populations from Commercial Cucurbit Fields in Spain.

Alejandra Vielba-Fernández, Álvaro Polonio, Laura Ruiz-Jiménez, Antonio de Vicente,
Alejandro Pérez-García y Dolores Fernández-Ortuño.

Journal of Fungi, 2021. 7, 733. doi:10.3390/jof7090733

Abstract

Powdery mildew is caused by *Podosphaera xanthii* and is one of the most important diseases that attacks Spanish cucurbit crops. Fungicide application is the primary control tool; however, its effectiveness is hampered by the rapid development of resistance to these compounds. In this study, the EC₅₀ values of 26 isolates were determined in response to the succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicides boscalid and fluopyram. From these data, the discriminatory doses were deduced and used for SDHI resistance monitoring during the 2018 and 2019 growing seasons. Of the 298 isolates analysed, 37.9% showed resistance to boscalid and 44% to fluopyram. Although different phenotypes were observed in leaf disc assays, the resistant isolates showed the same phenotype in plant assays. Compared to sensitive isolates, two amino acid changes were found in the SdhC subunit, A86V and G151R, which are associated mostly with resistance patterns to fluopyram and boscalid, respectively. Furthermore, no significant differences were observed in terms of fitness cost between the selected sensitive and resistant isolates analysed here. Lastly, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was developed to detect A86V and G151R mutations using conidia obtained directly from infected material. Our results show that growers could continue to use boscalid and fluopyram, but resistance management practices must be implemented.

Artículo 3

Heteroplasmy for the Cytochrome b gene in *Podosphaera xanthii* and its role in resistance to QoI fungicides in Spain.

Alejandra Vielba-Fernández, Davinia Bellón-Gómez, Juan A. Torés, Antonio de Vicente, Alejandro Pérez-García y Dolores Fernández-Ortuño.

Plant Disease, 2018. 102, 1599-1605. doi:10.1094/PDIS-12-17-1987-RE

Abstract

In Spain, management of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* is strongly dependent on chemicals such as quinone outside inhibitor (QoI) fungicides. In a previous report, widespread resistance to QoI fungicides in populations of *P. xanthii* in South central Spain was documented, but the molecular mechanisms of resistance remained unclear. In this work, the role of the Rieske-FeS (*risp*) and the cytochrome b (*cytb*) genes mutations in QoI resistance of *P. xanthii* were examined. No point mutations in the *risp* gene were found in the three QoI-resistant isolates analyzed. For *cytb*, sequence analysis revealed the presence of a G143A substitution that occurs in many QoI-resistant fungi. This mutation was always detected in QoI-resistant isolates of *P. xanthii*; however, it was also detected in sensitive isolates. To better understand the role of heteroplasmy for *cytb* in QoI resistance of *P. xanthii*, an allele-specific quantitative polymerase chain reaction was developed to quantify the relative abundance of the G143 (sensitive) and A143 (resistant) alleles. High relative abundance of A143 allele (70%) was associated with isolates resistant to QoI fungicides; however, QoI-sensitive isolates also carried the mutated allele in frequencies ranged from 10% to 60%. Our data suggest that G143A mutation in *cytb* is the primary factor involved in QoI resistance of *P. xanthii* but the proportion of G143 and A143 alleles in an isolate may determine its QoI resistance level.

Artículo 4

Monitoring Methyl Benzimidazole Carbamate-Resistant isolates of the cucurbit powdery mildew pathogen, *Podosphaera xanthii*, using Loop-Mediated Isothermal Amplification.

Alejandra Vielba-Fernández, Antonio de Vicente, Alejandro Pérez-García y Dolores Fernández-Ortuño.

Plant Disease, 2019. 103, 1515-1524. doi:10.1094/PDIS-12-18-2256-RE

Abstract

Powdery mildew, caused by the fungus *Podosphaera xanthii*, is one of the most economically important diseases affecting cucurbit crops in Spain. Currently, chemical control offers the most efficient management of the disease; however, *P. xanthii* isolates resistant to multiple classes of site-specific fungicides have been reported in the Spanish cucurbit powdery mildew population. In previous studies, resistance to the fungicides known as methyl benzimidazole carbamates (MBCs) was found to be caused by the amino acid substitution E198A on β -tubulin. To detect MBC-resistant isolates in a faster, more efficient and more specific way than the traditional methods used to date, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system was developed. In this study, three sets of LAMP primers were designed. One set was designed for the detection of the wild type allele and two sets for the E198A amino acid change. Positive results were only obtained with both mutant sets; however, LAMP reaction conditions were only optimized with the primer set2, which was selected for optimal detection of the E198A amino acid change in *P. xanthii*-resistant isolates, along with the optimal temperature and duration parameters of 65°C for 75 min, respectively. Hydroxynaphthol blue (HNB) metal indicator was used for quick visualization of results through the color change from violet to sky-blue when the amplification was positive. HNB was added before the amplification to avoid opening the lids, thus decreasing the probability of contamination. To confirm that the amplified product corresponded to the β -tubulin gene, the LAMP product was digested with the enzyme LweI and sequenced. Our results have shown that the LAMP technique is a specific and reproducible method that could be used for monitoring MBC-resistance of *P. xanthii* directly in the field.

V.

DISCUSIÓN GENERAL

En estudios anteriores llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, se detectaron altos niveles de resistencia para diversas familias de fungicidas, incluyendo diferentes materias activas pertenecientes a los principales grupos químicos utilizados en agricultura (DMI, MBC y QoI). Por ello, en esta tesis doctoral nos planteamos conocer la presencia/ausencia y niveles de resistencia para una nueva familia de compuestos, los SDHI, registrada en los últimos años para el control del oídio de las cucurbitáceas. Considerando la rápida capacidad de este patógeno de desarrollar resistencia a un fungicida al poco tiempo de ser usado en el campo, no era de extrañar que detectáramos aislados de *P. xanthii* con niveles de resistencia medio-altos para boscalida y fluopiram. Estos resultados hicieron que nos planteáramos elucidar el mecanismo de resistencia implicado en la misma; además de para otra familia de fungicidas, los QoI, cuyo mecanismo era aún desconocido en España (Fernández-Ortuño et al. 2008b). Una vez determinados ambos mecanismos, se desarrollaron métodos de diagnóstico molecular rápido de la resistencia, a través de las técnicas ARMS-PCR, para los fungicidas QoI; y LAMP, para los fungicidas SDHI y los MBC, ya que estos últimos constituyen una de las familias de compuestos más antiguas introducidas en el mercado para el control de diversas enfermedades fúngicas.

1. Resistencia a los fungicidas en las diferentes especies de oídio.

De acuerdo con el FRAC, dentro del listado de patógenos de riesgo de desarrollo de resistencia podemos encontrar seis especies de oídios, dos de alto riesgo (*B. graminis* y *P. xanthii*) y cuatro con riesgo medio (*E. necator*, *Oidium neolycopersici*, *L. taurica* y *P. aphanis*; FRAC 2022) aunque, de acuerdo con la Organización Europea y Mediterránea para la Protección Vegetal (EPPO), *E. necator* podría ser considerado como un patógeno de alto riesgo. Estas especies son patógenas de especies económicamente relevantes como son los cereales, la vid, las cucurbitáceas o solanáceas como el tomate, y cada año aparecen nuevas publicaciones sobre problemas de resistencia a diversas materias activas registradas para su control. Para poder conocer más sobre la realidad de esta problemática y englobar todos estos estudios, en esta tesis doctoral se realizó una revisión bibliográfica de todos los trabajos relacionados con la resistencia a fungicidas en los oídios. En ella se puede observar como las especies clasificadas como de “alto riesgo”, por el FRAC o por la EPPO, son las que han desarrollado resistencia a la mayoría de las familias de fungicidas estudiadas y disponibles en el mercado de fitosanitarios (Figura V.1): *B. graminis*, incluyendo las subespecies del trigo y la cebada, ha mostrado resistencia a cuatro de las ocho familias de las que se han publicado trabajos; *E. necator* a seis familias; y *P. xanthii* a todas. Esto puede ser debido a las condiciones en las que se desarrollan los diferentes cultivos. Mientras que los cultivos de cereal y vid crecen al aire libre, permitiendo la entrada y salida de nuevos

aislados sensibles, el cultivo de las cucurbitáceas se suele realizar (aunque no siempre en su totalidad) de manera cubierta, ya sea en invernadero o bajo plásticos. Esto podría provocar un aislamiento de la población de *P. xanthii* y un fomento de selección de las cepas resistentes. Además, al tratarse en todos los casos de cultivos económicamente importantes, su producción a gran escala obliga a los agricultores a aplicar fungicidas con una mayor frecuencia e intensidad, buscando evitar grandes pérdidas económicas.

Las familias de fungicidas que más casos de resistencia han presentado son las más empleadas a nivel mundial, tanto para el oídio como para otras especies fúngicas, e incluyen los fungicidas DMI, MBC y QoI (Figura IV.1). Esto era esperado, puesto que una de las cualidades más interesantes para que los agricultores puedan usarlas es su amplio espectro de acción, de tal manera que con pocas aplicaciones son capaces de controlar a varios patógenos. Consecuentemente, para aquellas familias que han sido registradas únicamente para el control del oídio como, por ejemplo, las aril-fenil-cetonas, los aza-naftalenos, las hidroxi-(2-amino) pirimidinas, y las materias activas ciflufenamida y flutianil, pertenecientes a las fenil-acetamidas y tiazolidinas, respectivamente, el número de trabajos relacionados con una disminución de la sensibilidad a estos compuestos es menor (Dietz 2007). Aunque el incentivo del empleo de estos últimos compuestos debería ser realizado, estas moléculas no son tan versátiles como las familias más usadas. Por ejemplo, los aza-naftalenos han presentado un buen control sobre *B. graminis* y *E. necator*, presentando sólo casos de resistencia en *P. xanthii* en estudios realizados en los Estados Unidos (McGrath 2017), mientras que en aquellos realizados en España con el mismo patógeno se observaron altos niveles de sensibilidad (Bellón-Gómez et al. 2015). Aunque los resultados son buenos, esta familia de compuestos solo podría usarse de forma preventiva, ya que su principio activo está centrado en interrumpir las señales necesarias para la germinación de la espora (Dietz 2007), lo cual significa que si el patógeno ya ha atacado al cultivo se debería emplear otro grupo químico. Sin embargo, no deja de ser una buena alternativa en combinación con otros fungicidas y métodos de control.

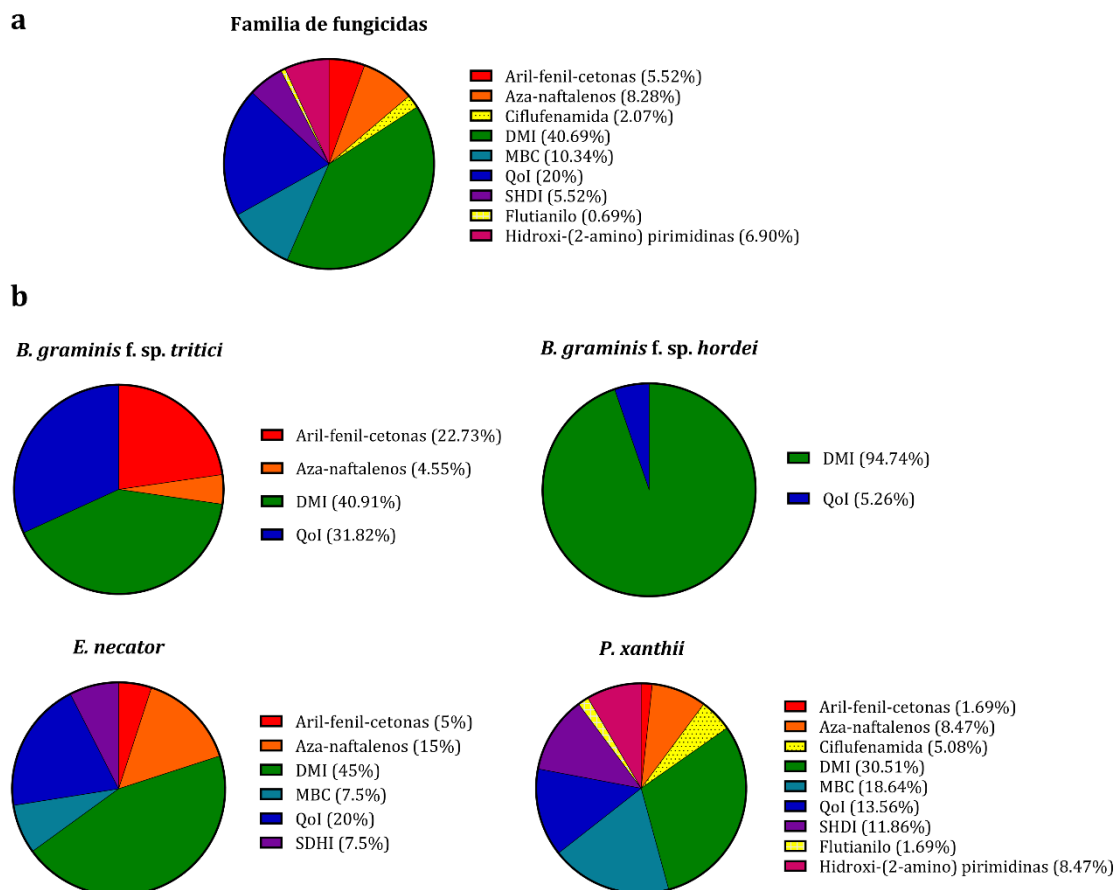


Figura V.1. Representación esquemática del porcentaje de trabajos publicados sobre resistencia a fungicidas en oídios, según la familia de fungicidas investigada (a) o el patógeno de estudio (b). Se presentan los resultados de aquellas especies de las que se dispone de datos sobre más de una familia química (*B. graminis* f. sp. *tritici*, *B. graminis* f. sp. *hordei*, *E. necator* y *P. xanthii*).

Centrándonos en el oídio de las cucurbitáceas, de las 19 materias activas que se encuentran registradas para su control en España, sólo para siete (bifaxen, bromuconazol, mefentrifluconazol, meptildinocap, metconazol, proquinazid y protioconazol) aún no se han publicado ningún estudio de emergencia de resistencia. Sin embargo, cuatro de ellas pertenecen a la misma familia química, los fungicidas DMI (bromuconazol, mefentrifluconazol, metconazol y protioconazol), y una pertenece a los fungicidas SDHI (bixafen), para los cuales ya se han reportado casos de resistencia cruzada entre ellos (Miyamoto et al. 2020). Por tanto, los fungicidas registrados que se podrían emplear para el control del oídio en los que aún no se haya descrito problemas de resistencia en otros países incluirían meptildinocap y proquinazid, siendo el primero un fungicida contacto y el segundo solo de acción preventiva. Esto nos muestra la importancia de una correcta aplicación y gestión del control químico por parte de los agricultores, ya que el oídio puede desarrollar resistencia a la mayoría de las herramientas químicas de las que disponen.

1.1. Resistencia a los fungicidas SDHI en poblaciones de *P. xanthii* en la mitad sur de España.

El lanzamiento de la segunda generación de los fungicidas SDHI fue de gran importancia en el mundo agrario. Después de los problemas de resistencia presentados por los fungicidas QoI, también inhibidores de la respiración mitocondrial, los SDHI parecían ser los sustitutos ideales debido a su buena eficacia en campo. Además, las nuevas formulaciones de estos fungicidas venían acompañados de mejores adyuvantes facilitando y mejorando su aplicación en la naturaleza (Steurbaut 1993). Debido al impacto que tuvieron y su importante incremento en ventas, su uso para el control de diversas enfermedades fúngicas en las principales regiones productoras del sur de España ha sido un hecho en los últimos años. Por este motivo, en esta tesis doctoral uno de los objetivos que nos planteamos fue analizar los niveles de resistencia a dos de los fungicidas SDHI más usados, boscalida y fluopiram. Los ensayos de monitorización de la resistencia fueron llevados a cabo en Almería, Granada, Málaga y Murcia durante las campañas de cultivo 2018 y 2019. De los 298 aislados totales analizados en estos dos años, un alto porcentaje de la población mostró altos niveles de resistencia a estos compuestos: para boscalida, el 37,9% de los aislados presentaron diferentes niveles de resistencia, aunque ningún aislado creció vigorosamente a la dosis de campo de 100 mg/L. Sin embargo, del 44% de aislados resistentes a fluopiram, el 22,5% presentó un fenotipo capaz de desarrollarse a 100 mg/L (dosis de campo) y el 17,4% creció vigorosamente en esta concentración. Como se ha comentado anteriormente, el empleo de estos fungicidas se ha visto incrementado de forma considerable durante los últimos años, por lo que la presencia de aislados resistentes era esperable en las poblaciones de *P. xanthii* obtenidas del sur de España. En especial, la materia activa fluopiram, cuyo uso se ha visto incrementado debido a su aplicación no solo para el control de hongos, sino también de nemátodos (Pedro Vega, comunicación personal). Además, y debido al volumen de carga de trabajo llevado a cabo por los agricultores, muchas veces los tratamientos no se realizan correctamente para ahorrar tanto tiempo como dinero, aplicándose estos productos a dosis subletales (Pedro Vega, comunicación personal), por lo que el riesgo de aparición de aislados resistentes aumentaría. Esta tendencia en el aumento de la resistencia debido al frecuente uso de estos fungicidas es un fenómeno que se ha extendido a otros patógenos fúngicos de gran interés agrícola, como son *A. alternata* (Avenot et al. 2014, 2019), *A. solani* (Mostafanezhad et al. 2022; Metz et al. 2019), *B. cinerea* (Veloukas et al. 2011; De Miccolis Angelini et al. 2014; Weber et al. 2015; Bertetti et al. 2019; Fernández-Ortuño et al. 2017), *P. teres* (Rehfus et al. 2016) y *Z. tritici* (Dooley et al. 2016; Hellin et al. 2020).

Por otro lado, también se han llevado a cabo estudios en los que se han mostrado problemas de resistencia cruzada entre los fungicidas QoI y SDHI, cuyas respectivas dianas forman parte de la respiración mitocondrial, los cuales podrían ser responsables del rápido aumento de resistencia de los últimos. En el estudio llevado a cabo por Li y colaboradores (2014), se analizó el perfil de resistencia de 412 aislados de *B. cinerea* a diversos fungicidas en Carolina del Norte y del Sur (EE. UU), observándose que ciertos fenotipos resistentes a piraclostrobina eran más propensos a desarrollar resistencia a boscalida. Otros trabajos realizados con el mismo patógeno en Europa (Bardas et al. 2010; Leroux et al. 2010; Markoglou et al. 2006), EE. UU. (Kim et al. 2011) y Japón (Ishii 2012) también describieron el mismo fenómeno en los aislados resistentes. Por otro lado, en un estudio realizado en Bélgica con los patógenos *A. solani* y *A. alternata*, se observó que el 40% de la población de *A. solani* y el 58% de *A. alternata* poseían resistencia cruzada con los fungicidas QoI (Landschoot et al. 2017). Aunque no se haya analizado la resistencia cruzada con otras materias activas en los aislados españoles analizados en esta tesis, sería interesante analizar los niveles de sensibilidad a los fungicidas QoI para poder aconsejar el uso o desuso de materias activas combinadas o alternadas de estas dos familias de compuestos químicos.

2. Bases moleculares de la resistencia a fungicidas QoI y SDHI.

Dentro de los posibles mecanismos moleculares de resistencia, el más comúnmente descrito son las mutaciones puntuales en genes de las proteínas diana de los diferentes fungicidas. En esta tesis doctoral se ha dilucidado las bases moleculares implicadas en la resistencia a los fungicidas QoI y SDHI en el oídio de las cucurbitáceas.

En el caso de los fungicidas QoI, la resistencia a estos compuestos suele estar gobernada por el cambio aminoacídico G143A, aunque otros cambios también han sido descritos por tener cierta implicación, como son F129L y G137R (FRAC, 2022). Todos ellos están localizados en el gen del citocromo b (*cytb*), de codificación mitocondrial (Fernández-Ortuño et al. 2008a). Mientras que el cambio G143A otorga altos niveles de resistencia a todas las materias activas pertenecientes a este grupo químico, los otros dos, confieren una resistencia parcial (FRAC 2022). Para la mayoría de los hongos patógenos de plantas, el alelo mutado A143 se encuentra de manera homoplásmica, es decir, sólo existe esa copia del alelo en el *pull* de ADN mitocondrial. Este es el caso de especies como *A. alternata* (Ding et al. 2019), *A. solani* (Ding et al. 2019), *B. graminis* f. sp. *hordei* (Bäumer et al. 2003), *C. beticola* (Kayamori et al. 2019), *M. graminicola* (Toriani et al. 2008); *P. viticola* (Toffolati et al. 2007; Chen et al. 2007) y *V. inaequalis* (Frederick et al. 2014), entre otras. Sin embargo, en algunos trabajos se ha observado que la presencia del alelo mutado y los niveles de resistencia a los fungicidas QoI

no siempre coincidía, como ocurría en *B. cinerea* (Kansako et al. 2005; Fountaine et al. 2007; Ishii et al. 2008, 2009; Asadollahi et al. 2013; Hashimoto et al. 2014), *C. cassicola* (Ishii et al. 2007), *Colletotrichum gloeosporioides* (Ishii et al. 2007), *Mycovellosiella nattrassi* (Ishii et al. 2007), *Pseudoperonospora cubensis* (Ishii et al. 2007), *V. inaequalis* (Villani and Cox, 2014) y *V. carpophila* (Luo et al. 2013). En el caso de los oídios, este fenómeno se ha observado en el oídio del manzano, *P. leucotricha* (Lesemann et al. 2009), y el del tomate, *L. taurica* (Mosquera et al. 2015). Además, en estudios anteriores realizados con aislados japoneses y españoles de *P. xanthii*, el fenómeno de la heteroplasmia o la implicación de un mecanismo diferente a las mutaciones puntuales ya se había planteado debido a la no detección del cambio G143A y los altos niveles de resistencia a los fungicidas QoI en ensayos *in vitro* (Ishii et al. 2007, 2009; Fernández-Ortuño et al. 2008b). Los resultados de esta tesis doctoral confirman el cambio G143A en citocromo b como el mecanismo responsable de la resistencia a los fungicidas QoI y que dicha mutación se encuentra de manera heteroplásmica en el ADN mitocondrial. De esta manera, sólo aquellos aislados que poseían el cambio G143A en más del 70% de los alelos mitocondriales presentaban el fenotipo resistente a los fungicidas QoI.

Respecto a los fungicidas SDHI, sólo se han detectado dos mutaciones puntuales implicadas con el fenotipo resistente (independientemente de los niveles de resistencia descritos en ensayos *in vitro*). Por un lado, el cambio aminoacídico A86V en la subunidad SdhC se identificó en todos los aislados resistentes a boscalida y fluopiram o solo a fluopiram; mientras que la sustitución G151R en la misma subunidad estuvo relacionada, en la gran mayoría de los casos, con la resistencia a boscalida. Estos dos cambios aminoacídicos ya habían sido descritos en aislados de *P. xanthii* resistentes a los fungicidas SDHI en Japón (Miyamoto et al. 2020), además de en otros hongos fitopatógenos como *B. cinerea*, *C. cassicola*, *S. homeocarpa* y *Z. tritici* (Amiri et al. 2019; Zhu et al. 2020; Yamashita et al. 2018; Stammler et al. 2015; Popko et al. 2018).

Estas diferencias de sensibilidad por parte de los patógenos resistentes hacia las materias activas boscalida y fluopiram eran predecibles, puesto que ambos compuestos poseen una estructura química diferente (Figura V.4): la molécula de fluopiram es más lineal y larga, presentando grupos flúor; mientras que la de boscalida es más corta y presenta grupos cloro (Fraaije et al., 2012; Musson y Young, 2012).

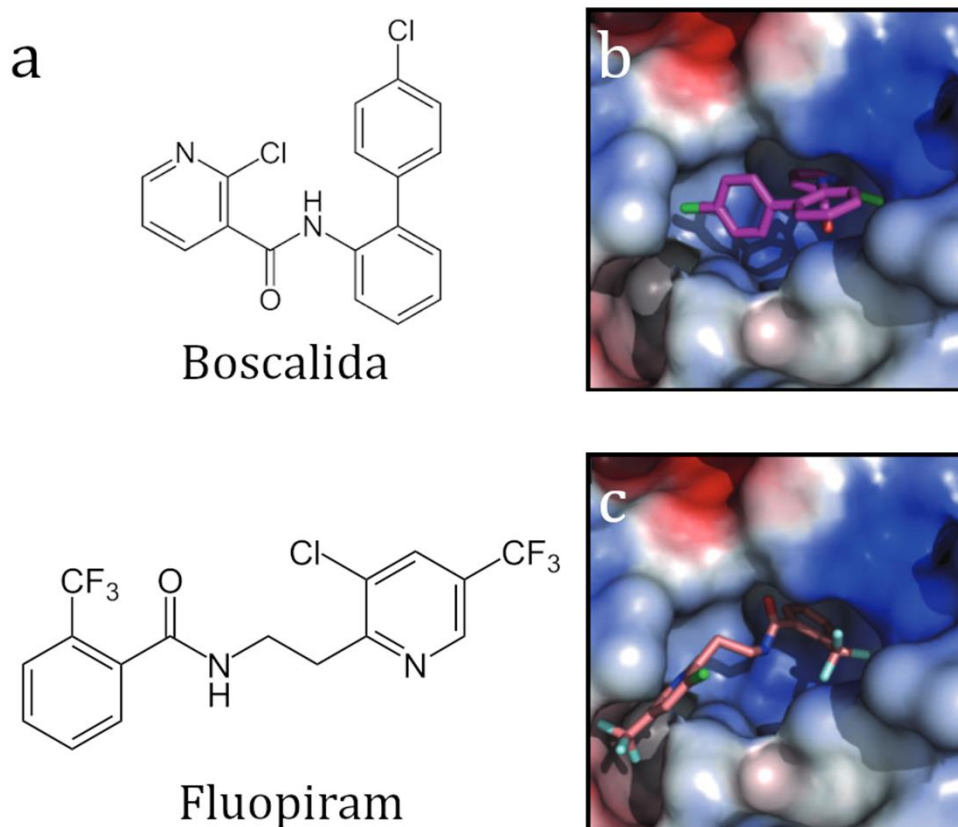


Figura V.2. Estructura de los fungicidas SDHI boscalida y fluopiram y representación de su sitio de unión. (a) Estructura en 2D de los fungicidas SDHI boscalida (arriba) y fluopiram (abajo). (b) Representación de la unión de la boscalida al sitio de unión de la quinona del succinato deshidrogenasa. (c) Representación de la unión del fluopiram al sitio de unión de la quinona del succinato deshidrogenasa. El potencial electrostático de la proteína está coloreado desde el rojo (carga negativa) hasta el azul (carga positiva) en (b) y (c). Modificado de Fraaije et al. 2012.

Esto provocaría una unión diferente al bolsillo catalítico de succinato deshidrogenasa y, por tanto, un efecto diferente de las diferentes mutaciones implicadas en la resistencia a esta familia de compuestos. De esta manera, el cambio A86V interaccionaría mediante fuerzas de Van-der-Waals con el anillo de piridina y la cadena alifática de fluopiram, una característica específica de esta molécula. Por ello, la presencia de mutaciones que deriven en este cambio estaría relacionadas con factores de resistencia mayores para el fluopiram que para otras materias activas pertenecientes a los fungicidas SDHI (Amiri et al. 2019; Scalliet et al. 2012; Stammlet et al. 2015; Yamashita et al. 2018; Zhu et al. 2020). Por otro lado, esta mutación está próxima a una serina presente en el sitio de unión a la quinona, muy conservada entre diferentes patógenos y conocida por interaccionar directamente con los fungicidas SDHI mediante un puente de hidrógeno (Ruprecht et al. 2009; Scalliet et al. 2012). Por tanto, este cambio también impediría la formación del puente de hidrógeno con el fungicida, reduciendo así la sensibilidad a otros compuestos pertenecientes a esta familia

(Amiri et al. 2019). En cuanto al cambio G151R, esta sustitución se había observado en estudios anteriores en aislados de *P. xanthii* (Miyamoto et al. 2020) y *S. homeocarpa* (Popko et al. 2018), resistentes a boscalida, fluxapirozad, isofetamida y pentiopirad, pero no a fluopiram. Aunque se han realizado pocos estudios de modelado de proteínas para dilucidar la implicación de esta sustitución en la interacción con los fungicidas SDHI, se conoce que esta posición forma parte del sitio unión de diferentes fungicidas SDHI con la subunidad C del succinato deshidrogenasa (Popko et al. 2018).

Dentro de los resultados presentados en esta tesis, la mayoría de los aislados en los que se detectó el cambio A86V fueron resistentes a boscalida y fluopiram; sin embargo, once aislados obtenidos en 2019, que también mostraron este cambio, fueron sensibles a boscalida, pero resistentes a fluopiram. Esto podría indicar que la resistencia a boscalida observada en la mayoría de los aislados podría estar mediada por mecanismos diferentes a la modificación de la diana del fungicida, como, por ejemplo, la implicación de transportadores de membrana o la detoxificación de la molécula. Esta falta de correlación entre mutaciones puntuales en la diana de estos compuestos y la resistencia a los fungicidas SDHI ya había sido observada en otros patógenos fúngicos como *E. necator*, *M. fruticola* y *Z. tritici* (Chen et al. 2013; Yamashita et al. 2018; Stergiopoulos et al. 2021).

La implicación de transportadores de membrana es un mecanismo normalmente asociado al fenómeno de la multirresistencia a fungicidas (Del Sorbo et al. 2000; De Waard et al. 2006; Kretschmer 2012). En general, existen dos familias de transportadores implicadas en la expulsión de tóxicos: los transportadores ABC y los transportadores MFS (Del Sorbo et al. 2000; De Waard et al. 2006). Los transportadores ABC son una de las familias más grandes de transportadores de membrana conocidas, la cual parece estar implicada en fenómenos de resistencia multidroga en hongos como *B. cinerea* y *Mycosphaerella graminicola* (De Waard et al. 2006) a diferentes compuestos no relacionados químicamente. Estas proteínas son capaces de unir el ATP e hidrolizarlo, obteniendo así la energía suficiente para transportar moléculas a través de la membrana, incluso en contra del gradiente electroquímico (Del Sorbo et al. 2000). Al contrario, los transportadores MFS emplean la fuerza motriz de protones generada por el potencial de membrana y el gradiente electroquímico, siendo clasificados por llevar a cabo un transporte activo secundario (Del Sorbo et al. 2000). Estos transportadores también han sido asociados con la resistencia a diversos fungicidas en *B. cinerea*, *M. graminicola* y *P. digitatum* (Kretschmer 2012). Respecto a los fungicidas SDHI, son varios los trabajos que han relacionado la implicación de los transportadores ABC y MFS en aislados que presentan una sensibilidad reducida a estos y otros compuestos antifúngicos. Por ejemplo, para *S. homeocarpa* y *Z. tritici* se ha

observado una sobreexpresión de los genes *ShPDR1*, *ShartD* y *ShDR1*, que codifican para los transportadores ABC (Sang et al. 2015, 2018), o el gen *BcMFS1* para los transportadores MFS (Roohparvar et al. 2007; Omrane et al. 2017). Curiosamente, en el trabajo realizado en *S. homeocarpa* se observó que al emplear el fungicida SDHI boscalida para el control de este patógeno se seleccionaban aislados resistentes a los fungicidas DMI, demostrando posteriormente la implicación de los transportadores ABC (Allan-Perkins et al. 2017). En el oídio de las cucurbitáceas no se ha publicado ningún trabajo sobre la presencia y posible implicación de este tipo de transportadores en la resistencia a fungicidas, pero sí en otros oídios, como es el caso de *B. graminis* f. sp. *tritici*. En el oídio del trigo se ha observado que el gen *BgABC1* está implicado en la sobreexpresión de un transportador ABC implicado en la resistencia a triadimefon, un fungicida DMI, en semillas (Hu et al. 2008). Estudiar la posible implicación de este tipo de mecanismo secundario en la resistencia a los fungicidas SDHI en *P. xanthii* podría esclarecer las bases moleculares subyacentes. Además, sería interesante analizar la posible resistencia cruzada en aquellos aislados que puedan estar sobreexpresando estos transportadores, para tener en cuenta esta información y poder aconsejar a los agricultores correctamente sobre las posibles combinaciones de fungicidas para controlar la enfermedad en la naturaleza.

3. Detección molecular de mutaciones implicadas en la resistencia a fungicidas QoI, SDHI y MBC.

El análisis de resistencia clásico se ha basado en ensayos biológicos centrados la respuesta del patógeno frente a distintas concentraciones del fungicida. En aquellos hongos que no requieren del huésped vivo, estos ensayos suelen estar basados en analizar el desarrollo del micelio o la germinación de las esporas (Secor y Rivera 2011) sobre medio no tratado (control) o tratado con el compuesto de estudio. Sin embargo, los hongos biotrofos obligados como los oídios requieren del huésped vivo para su desarrollo, lo que complica seriamente su manejo en el laboratorio. Tanto el mantenimiento como el propio ensayo de sensibilidad a fungicidas requiere del uso del huésped como base, necesitándose tanto su crecimiento previo como la adaptación de las propias técnicas. De esta manera, para poder analizar el desarrollo del micelio o la germinación de esporas es necesario emplear discos de hoja que son previamente incubados con diferentes concentraciones del fungicida. Esto, por tanto, supone un gasto de recursos y tiempo que limita el número de aislados que se pueden mantener y analizar en el laboratorio. Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, como la mayoría de las resistencias descritas suelen estar determinadas por mutaciones puntuales en la diana del fungicida (Ma y Michailides 2005), el empleo de

técnicas moleculares nos permite conocer de forma más rápida el genotipo de un determinado aislado o población en comparación con los clásicos ensayos de sensibilidad *in vitro*.

3.1 Detección ARMS-qPCR del cambio G143A implicados en la resistencia a fungicidas QoI.

Si la resistencia viene definida por una mutación puntual en un gen mitocondrial, como es el caso del cambio G143A en el gen *cytb*, el papel de la heteroplasma mitocondrial puede suponer un impedimento a la hora de monitorizar la resistencia, ya que una elección incorrecta de las técnicas a emplear para el análisis molecular puede dar resultados erróneos. Por ejemplo, el empleo de la Amplificación por Desplazamiento Múltiple (MDA) en el estudio de la resistencia a los fungicidas QoI en *P. xanthii* (Fernández-Ortuño et al. 2008a, 2008b) tenía la ventaja de obtener ADN de forma fácil y rápida comparando con otros métodos de extracción convencionales; sin embargo, esta técnica amplificaba selectivamente el alelo G143 del gen *cytb*, dificultando la detección de la mutación G143A. En otro trabajo, el empleo de técnica PCR-RFLP no siempre detectaba la presencia del alelo mutado, sobre todo si este se encontraba en un porcentaje bajo en la población, obteniéndose resultados contradictorios con los bioensayos *in vitro* (Ishii et al. 2009). La aproximación con la que se obtuvieron mejores resultados fue la realizada por Villani y Cox, los cuales desarrollaron reacciones de PCR cuantitativa para correlacionar un fenotipo resistente con un 62% de presencia del alelo resistente (A143) en *V. inaequalis* (Villani and Cox 2014). Posteriormente, y de la misma manera, Mosquera y colaboradores correlacionaron la resistencia a fungicidas QoI de *L. taurica* con la presencia del alelo A143 en torno al 40% en el pull de alelos *cytb* mitocondriales (Mosquera et al. 2017). En el caso de *P. xanthii*, en esta tesis se ha determinado que la presencia del 70 % del alelo A143 en el conjunto general del ADN mitocondrial confiere un fenotipo resistente a todos los compuestos que forman parte de los fungicidas QoI. A través de la técnica ARMS-qPCR se ha podido llevar a cabo la cuantificación de estos alelos y poder diferenciar entre aislados sensibles y resistentes de una manera molecular; sin embargo, se requiere de la extracción de ADN con métodos convencionales y el empleo de una metodología sofisticada.

3.2 Detección LAMP de los cambios E198A, A86V y G151R implicados en la resistencia a fungicidas MBC y SDHI.

En aquellos casos en los que la resistencia viene determinada por una mutación en el ADN nuclear, como es el caso de la resistencia a los fungicidas SDHI, se pueden emplear técnicas cualitativas y cuantitativas para su detección. En estudios previos con otros patógenos

fúngicos, se han empleado técnicas basadas en el uso de enzimas de restricción para la detección de mutaciones en el gen *sdhb* de *B. cinerea* (Veloukas et al. 2011) o los genes *sdhb* y *sdhc* en *Sclerotinia* spp. (Lee et al. 2021). Esta técnica requiere de dos reacciones consecutivas, una amplificación mediante PCR y una digestión con la correspondiente enzima de restricción, además de la visualización de los productos en geles de agarosa. A pesar de ser una elección asequible y sencilla para la mayoría de los laboratorios, requiere tiempo para poder conocer los resultados. Por ello, otra de las técnicas más utilizadas para los fungicidas SDHI suele ser la AS-PCR, que además puede ser optimizada para detectar diferentes mutaciones de forma simultánea. Esta técnica se ha empleado de forma satisfactoria en hongos fitopatógenos como *A. alternata* (Lichtemberg et al. 2018), *A. solani* (Bauske et al. 2018; Mallik et al. 2014) y *B. cinerea* (Yin et al. 2011), llegando a detectarse hasta 5 mutaciones diferentes en un mismo gen (Lichtemberg et al. 2018). Como el resultado final de esta técnica es cualitativo, puesto que sólo podemos observar la presencia o ausencia de amplificación en el gel de agarosa, algunos investigadores han llegado a optimizarla para que sea cuantitativa (AS-PCR cuantitativa), de tal manera que se puede saber la cantidad de cada alelo, el silvestre y el mutante, en la muestra problema (De Miccolis Angelini et al. 2014; Simões et al. 2018). La ventaja que presenta este tipo de técnicas es que se pueden analizar varias muestras en una misma reacción, disminuyendo tanto el tiempo de diagnóstico total como la cantidad de reactivo empleado. Además, la forma cuantitativa no requiere de un gel de agarosa para la lectura de resultados, lo cual agiliza el proceso. Otra técnica que ofrece ventajas similares es la High-Resolution Melting (HRM), que se basa en el estudio y comparación de curvas de fusión de las cadenas de ADN, la cual ha sido usada con buenos resultados, para la detección simultánea de las mutaciones P225H/F/L/T, N230I, H272L/R/Y del gen *sdhb* en *B. cinerea* (Chatzidimopoulos et al. 2014; Samaras et al. 2016).

Aunque las técnicas presentadas anteriormente nos ofrecen resultados más rápidos que con los ensayos de sensibilidad a fungicidas *in vitro*, requieren de un procesamiento largo para la obtención del ADN de las muestras, equipamiento adecuado y un tiempo específico de reacción. Por ello, en esta tesis nos planteamos poner a punto, por primera vez en un oídio, la técnica LAMP para una detección molecular rápida y fiable de la resistencia a los fungicidas MBC y SDHI. El LAMP sólo requiere de un baño (en su versión más simple) o de una maquinaria específica para tener una lectura de los resultados directa. Con respecto a los fungicidas SDHI, esta técnica se ha empleado para la detección de la mutación H278R del gen *sdhb* en *B. cinerea* (Fan et al. 2018) y de N75S en el gen *sdhc* de *C. cassicola* (Zhu et al. 2020) en tan solo una hora. Además, en el trabajo de Fan y colaboradores (2018) se usó

como base de la amplificación ADN obtenido, en tan solo 5 min, desde esporas fúngicas, acelerando el tiempo de obtención de los resultados LAMP. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis doctoral podemos afirmar que esta técnica ha demostrado ser una buena herramienta para la monitorización de la resistencia en *P. xanthii*, tanto para los fungicidas MBC como para los fungicidas SDHI. En ambos casos se realizó una extracción de ADN rápida a través de choques térmicos sobre las esporas de *P. xanthii*, permitiendo el uso de esta técnica empleando directamente muestras recolectadas del campo. Además, se pusieron a punto dos procedimientos diferentes para la ejecución de esta: para los fungicidas MBC, el empleo de un baño y un indicador de metales, y para los fungicidas SDHI, un equipo especializado para la lectura de resultados tras las correspondientes amplificaciones LAMP. La finalidad del primer trabajo fue realizar una aproximación más asequible para laboratorios de diagnóstico pequeños u organizaciones con pocos recursos, al emplearse un baño para la incubación y un cambio de color de violeta a azul cielo para la detección de aislados resistentes. De esta manera, y tras la llegada de las muestras a procesar, se obtendrían resultados en aproximadamente una hora y media, pudiendo informar al agricultor en un corto espacio de tiempo sobre la problemática o no de la resistencia a los fungicidas MBC en su parcela. Por otro lado, para los fungicidas SDHI, se usó una máquina específica de LAMP, que permite detectar, en menos de media hora, aislados que porten la mutación de interés, minimizando así los posibles errores subjetivos de cambio de color anterior. Mejoras de esta técnica hacia el desarrollo de determinaciones cuantitativas, han sido llevadas a cabo recientemente para la detección de virus de animales (He et al. 2020; Gong et al. 2021). En un futuro sería muy interesante desarrollar variantes cuantitativas también en nuestro patógeno de estudio para estos y otros fungicidas empleados para su control.

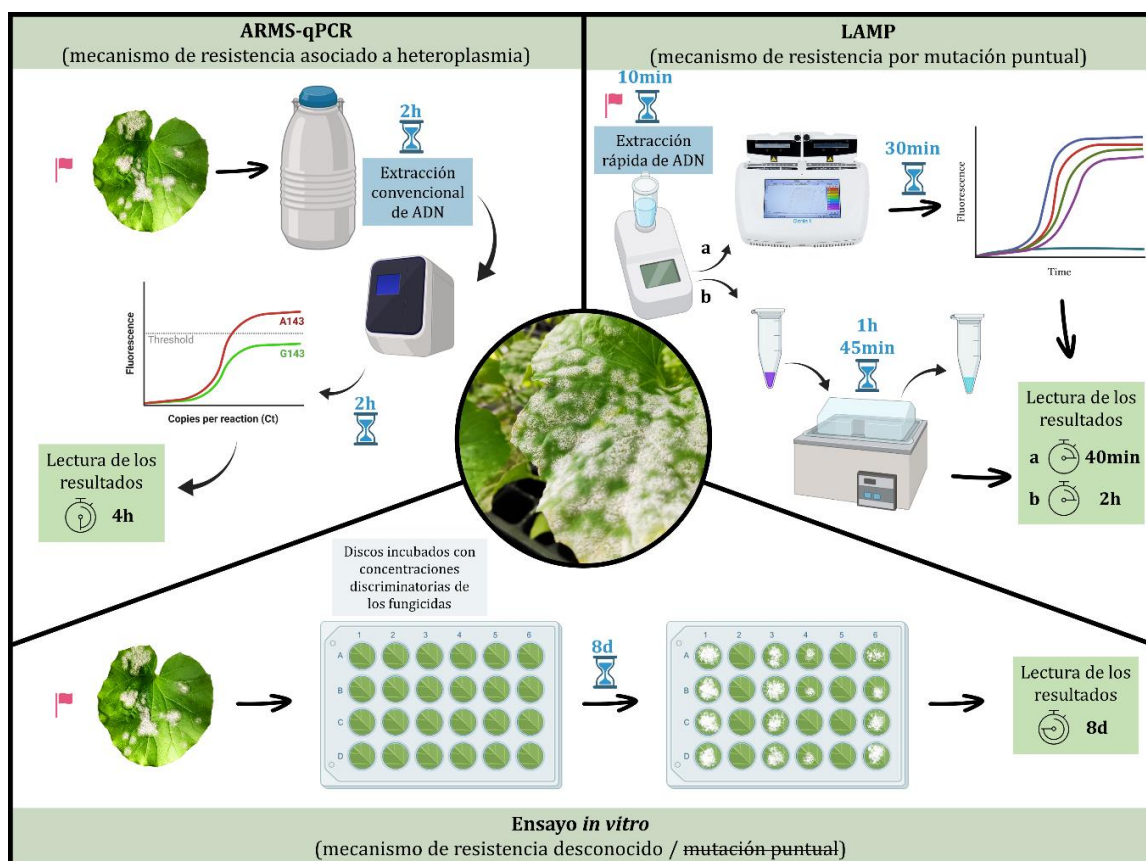


Figura V.3. Esquema de las aproximaciones usadas para el diagnóstico y la cuantificación de la resistencia a fungicidas en *P. xanthii* empleadas en esta tesis doctoral. En la parte superior se muestran las dos aproximaciones moleculares utilizadas dependiendo de la naturaleza de la resistencia. En la inferior el ensayo de discos de hoja utilizado cuando no se conoce el mecanismo o no está determinado por mutaciones puntuales.

4. Manejo de la resistencia en poblaciones de *P. xanthii*.

En los resultados obtenidos en los diferentes trabajos presentados en esta tesis doctoral, se ha demostrado que *P. xanthii* sigue siendo un patógeno con un alto riesgo de desarrollo de resistencia a fungicidas, como así ha ocurrido con los recientemente registrados fungicidas SDHI. Esta capacidad de desarrollar resistencia también se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios a nivel mundial, publicándose diferentes trabajos sobre la sensibilidad disminuida a diferentes grupos químicos: aza-naftalenos (Miazzi y McGrath 2008; McGrath 2013, 2017), benzoilpiridinas (Miyamoto et al. 2020), fenil-acetamidas (Pirondi et al. 2014; Mike y Quesada-Ocampo 2017; McGrath y Sexton 2018), hidroxí (2-amino-) pirimidinas (Malathrakís 1986; O'Brien et al. 1988; Moustafa et al. 1990a, 1990b; Bellón-Gómez et al. 2015), fungicidas DMI (O'Brien et al. 1988; O'Brien 1994; Malathrakís 1986; Ohtsuka et al. 1988; Kim et al. 2008; López-Ruiz et al. 2010; Lebeda et al. 2010; McGrath 2008; McGrath y Shishkoff 2001), fungicidas MBC (Bellón-Gómez et al. 2015; Sedláková y Lebeda 2008; Lebeda et al. 2010), fungicidas QoI (Fernández-Ortuño et al. 2006; McGrath y Shishkoff

2003; Sedláková et al. 2012; Lebeda et al. 2010), fungicidas SDHI (McGrath 2008; Keinath et al. 2018; Miyamoto et al. 2010, 2020) y tiazolidinas (Miyamoto et al. 2020). Esta falta de sensibilidad generalizada a diferentes grupos químicos es de especial interés en *P. xanthii*, patógeno cuyo control, hoy en día, está basado principalmente en el empleo de fungicidas. Por ello, y para evitar un uso incorrecto de estas herramientas de fitoprotección que puedan derivar tanto en un perjuicio económico para el agricultor como para las empresas fitosanitarias, existen diversas recomendaciones generales para optimizar la eficacia de estos compuestos en el tiempo (Bosch et al. 2015; Karlsson et al. 2020):

- *Emplear la dosis de campo recomendada por el fabricante*, puesto que dosis subletales pueden favorecer el desarrollo de cepas resistentes, y dosis demasiado altas incrementan la presión de selección.
- *Limitar el uso de aplicaciones por campaña*, puesto que se ha observado que, al incrementar las aplicaciones, puede aumentar la presencia de aislados resistentes (Bosch et al. 2015).
- *Emplear mezclas con los fungicidas de riesgo*, pudiendo así disminuir la dosis de éstos y evitar la selección de cepas resistentes, siempre y cuando no pertenezca a la misma familia química.
- *Realizar alternancias en las aplicaciones* con un fungicida de diferente modo de acción.

Aunque las medidas propuestas pueden ayudar a disminuir en gran medida la aparición de resistencia, un control de éstas sería adecuado para confirmar que están funcionando. Una buena estrategia para realizar esta monitorización sería emplear alguna de las técnicas de detección molecular que han sido presentadas en esta tesis doctoral, las cuales se complementarían con ensayos biológicos para ciertas clases químicas de las que no dispusiéramos de información sobre su correspondiente diana y, por tanto, mecanismo molecular de resistencia.

Con la introducción del Pacto Verde Europeo (European Commission 2019), siendo uno de sus objetivos la reducción al 50% del uso de pesticidas para el 2030, la optimización del empleo de fungicidas está empezando a convertirse en una necesidad urgente. Uno de los objetivos dentro de este proyecto europeo es la implementación del Manejo Integrado de las Plagas o IMP (*Integrated Pest Management*), que es una propuesta desarrollada para combatir plagas y enfermedades usando una combinación de métodos sostenibles, haciéndose menos dependientes de los pesticidas sintéticos (Karlsson et al. 2020). Este método está basado en la idea de que las plantas cultivadas pueden tolerar ciertos niveles

de daño sin que su rendimiento se vea afectado económicamente (Higley y Peterson 1996). De esta manera, la densidad mínima de plaga que supera este umbral y empieza a causar un perjuicio definiría el Nivel de Daño Económico (NDE) (Bueno et al. 2020). El manejo de plagas se suele realizar antes de alcanzar este nivel, en lo conocido como Umbral Económico (UE) (Pedigo et al. 1986) ya que proporciona una ventana de tiempo para aplicar tratamientos y medidas sin llegar a producirse las pérdidas económicas. El IPM no está formado únicamente por los métodos de control de plagas aplicados en este Umbral, como son los pesticidas o el control biológico, sino que implica también acciones de prevención, observación y monitorización del patógeno (Figura IV.4). Para ello, entre otras aproximaciones, se puede realizar una combinación de prácticas culturales, un empleo de cultivares resistentes y una monitorización del patógeno, ya sea realizando un seguimiento de las condiciones climatológicas para detectar cuándo son más favorables para la aparición del mismo, realizando un control del aumento de la presencia de esporas en el ambiente o de los niveles de resistencia presentes en la población, sabiendo así qué tratamiento será más eficaz de antemano. Cuando todos los datos obtenidos anteriormente nos indiquen que nos aproximamos al UE, sería momento de empezar el manejo de la enfermedad mediante una combinación de métodos, como son la eliminación física del patógeno, el control biológico y, de una forma racional y controlada, el empleo de químicos (Figura V.4).

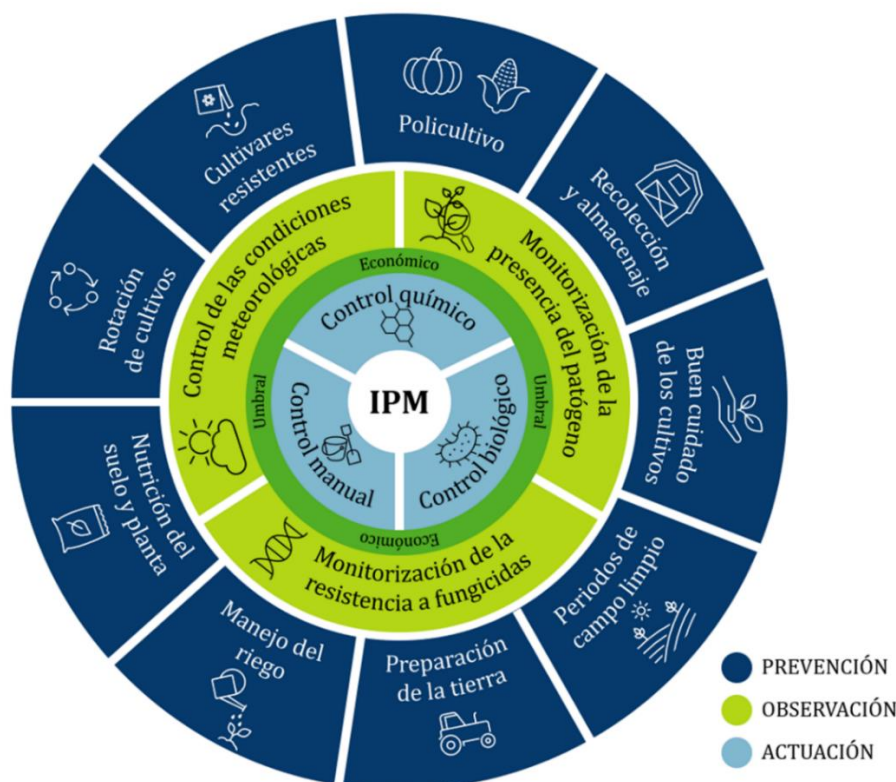


Figura V.4. Esquema simplificado de las estrategias que integran el Manejo Integrado de Plagas (IPM). Imagen modificada de CropLife Europe 2022.

El IPM es crucial para una agricultura sostenible, evitando el uso innecesario de fungicidas, ya que no solo incluye un uso racional de estos a través de la adopción de este UE, sino que también es una combinación armoniosa de diferentes estrategias (Kogan 1998), cada una de las cuales puede influir más o menos en el manejo de las plagas, pero son sus efectos aditivos los que pueden reducir significativamente las pérdidas de rendimiento (Dara 2019). Este IPM busca integrar los diferentes métodos y la explotación de sus efectos combinados, por encima de la eficacia individual de cada uno de los componentes (Stenberg 2017). Así, el control del oídio no sólo dependería del empleo de químicos que puede desembocar en el desarrollo de resistencias en poco tiempo, sino en un conjunto de técnicas que sirven como alternativa al uso de fungicidas. Si en algún momento estas medidas no fueran suficientes para evitar el desarrollo de la enfermedad, el empleo de unos fungicidas cuyo uso no ha sido abusivo sería suficientemente eficaz como para poder erradicarla, permitiendo así un control más sostenible para el medio ambiente y más económico para el agricultor.

5. Referencias

- Allan-Perkins E, Campbell-Nelson K, Popko JT, Sang H, Jung G. 2017. Investigating selection of demethylation inhibitor fungicide-insensitive *Sclerotinia homoeocarpa* isolates by boscalid, flurprimidol, and paclobutrazol. *Crop Science*. 57:S-301-S-309.
- Amiri A, Zuniga I, Peres N. 2019. Mutations in the membrane-anchored SdhC subunit affect fitness and sensitivity to succinate dehydrogenase inhibitors in *Botrytis cinerea* populations from multiple hosts. *Phytopathology*. 110:327-335.
- Asadollahi M, Szojka A, Fekete E, Karaffa L, Takács F, Flippin M, Sándor E. 2013. Resistance to QoI fungicide and cytochrome b diversity in the Hungarian *Botrytis cinerea* population. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 15:397-408.
- Avenot HF, Luna M, Michailides TJ. 2019. Phenotypic and molecular characterization of resistance to the SDHI fungicide fluopyram in populations of *Alternaria alternata* from pistachio orchards in California. *Crop Protection*. 124:104838.
- Avenot HF, van den Biggelaar H, Morgan DP, Moral J, Joosten M, Michailides TJ. 2014. Sensitivities of baseline isolates and boscalid-resistant mutants of *Alternaria alternata* from pistachio to fluopyram, penthiopyrad, and fluxapyroxad. *Plant Disease*. 98:197-205.

- Bäumler S, Sierotzki H, Gisi U, Mohler V, Felsenstein FG, Schwarz G. 2003. Evaluation of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates for resistance to strobilurin fungicides with different SNP detection systems. *Pest Management Science*. 59:310–314.
- Bardas GA, Veloukas T, Koutita O, Karaoglanidis GS. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science*. 66:967–973.
- Bauske MJ, Mallik I, Yellareddygar SKR, Gudmestad NC. 2018. Spatial and temporal distribution of mutations conferring QoI and SDHI resistance in *Alternaria solani* across the United States. *Plant Disease*. 102:349–358.
- Bellón-Gómez D, Vela-Corcía D, Pérez-García A, Torés JA. 2014. Sensitivity of *Podosphaera xanthii* populations to anti-powdery-mildew fungicides in Spain. *Pest Management Science*. 71:1407–1413.
- Bertetti D, Monchiero M, Garibaldi A, Gullino ML. 2019. Monitoring activities on fungicide resistance in *Botrytis cinerea* carried out in vineyards in North-West Italy in 2018. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 127:123–127.
- Bosch FVD, Paveley N, Fraaije B, Berg FVD, Oliver R. 2015. Evidence-based resistance management: a review of existing evidence. En: Ishii H, Hollomon, D, editores. *Fungicide resistance in plant pathogens*. Tokio, Japón: Springer. p. 63-76.
- Bueno AF, Panizzi AR, Hunt TE, Dourado PM, Pitta RM, Gonçalves J. 2020. Challenges for adoption of Integrated Pest Management (IPM): the soybean example. *Neotropical Entomology*. 50:5–20.
- Chatzidimopoulos M, Ganopoulos I, Madesis P, Vellios E, Tsaftaris A, Pappas AC. 2014. High-resolution melting analysis for rapid detection and characterization of *Botrytis cinerea* phenotypes resistant to fenhexamid and boscalid. *Plant Pathology*. 63:1336–1343.
- Chen F, Liu X, Chen S, Schnabel E, Schnabel G. 2013. Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both propiconazole and boscalid. *Plant Disease*. 97:645–651.
- Chen W-J, Delmotte F, Cervera SR, Douence L, Greif C, Corio-Costet M-F. 2007. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:5162–5172.

CropLife Europe (2022) What is IPM? [citado el 26 abril 2022] Disponible en: <https://croplifeeurope.eu/news/what-is-ipm/>

Dara SK. 2019. The new integrated pest management paradigm for the modern age. *Journal of Integrated Pest Management*. 10:1–9.

De Miccolis Angelini RM, Masiello M, Rotolo C, Pollastro S, Faretra F. 2014. Molecular characterisation and detection of resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science*. 70:1884–1893.

De Waard MA, Andrade AC, Hayashi K, Schoonbeek H, Stergiopoulos I, Zwiers L-H. 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science*. 62:195–207.

Del Sorbo G, Schoonbeek H, De Waard MA. 2000. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology*. 30:1–15.

Dietz J. 2007. Recently introduced powdery mildew fungicides. En: Jeschke P, Witschel M, Krämer W, Schirmer U, editores. *Modern Crop Protection Compounds*. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH. p. 727-738.

Ding S, Halterman D, Meinholz K, Gevens AJ. 2019. Distribution and stability of QoI fungicide resistance in populations of potato pathogenic *Alternaria* spp. in Wisconsin. *Plant Disease*. 103:2033-2040.

Dooley H, Shaw MW, Mehenni-Ciz J, Spink J, Kildea S. 2016. Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI-insensitive field isolates carrying the SdhC-H152R and SdhD-R47W substitutions. *Pest Management Science*. 72:2203–2207.

Fan F, Yin WX, Li GQ, Lin Y, Luo CX. 2018. Development of a LAMP method for detecting SDHI fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. 102:1612–1618.

Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, Chamorro M, de la Peña E, de Vicente A, Torés JA. 2017. Resistance to the SDHI fungicides boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from commercial strawberry fields in Spain. *Plant Disease*. 101:1306–1313.

Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, López-Ruiz F, Romero D, de Vicente A, Torés JA. 2006. Occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 115:215–222.

Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García A. 2008a. Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Pest Management Science*. 64:694-702.

Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García A. 2008b. Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Pest Management Science*. 64:694-702.

Fountaine JM, Takahashi K, Nishimura K, Inada M, Ishii H. 2007. Heteroplasmy and its role in QoI resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Japanese Journal of Phytopathology* 73:254–255.

Fraaije BA, Bayon C, Atkins S, Cools HJ, Lucas JA, Fraaije MW. 2012. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat. *Molecular Plant Pathology*. 13:263-275.

FRAC. 2022. FRAC Pathogen Risk List [citado el 26 de abril de 2022] Disponible en: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf?sfvrsn=caf3489a_2

FRAC. 2021. Mutations associated with Qo resistance [citado el 26 de abril de 2022] Disponible en: https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/qoi-quick-references/mutations-associated-with-qo-resistance.pdf?sfvrsn=c9db449a_4

Frederick ZA, Villani SM, Cooley DR, Biggs AR, Raes JJ, Cox KD. 2014. Prevalence and stability of qualitative QoI resistance in populations of *Venturia inaequalis* in the northeastern United States. *Plant Disease*. 98:1122-1130.

Gong H, Li Q, Zhang H, Ye L, Shi L, Feng Y. 2021. Development and comparison of qPCR and qLAMP for rapid detection of the decapod iridescent virus 1 (DIV1). *Journal of Invertebrate Pathology*. 182:107567.

Hashimoto M, Aoki Y, Saito S, Suzuki S. 2014. Characterisation of heteroplasmic status at codon 143 of the *Botrytis cinerea* cytochrome b gene in a semi-quantitative AS-PCR assay. *Pest Management Science*. 71:467–477.

He D, Yang J, Jiang X, Lin Y, Chen H, Tang Y, Diao Y. 2020. A quantitative Loop-Mediated Isothermal Amplification assay for detecting a novel goose astrovirus. *Poultry Science*. 99:6586–6592.

Hellin P, Duvivier M, Clinckemaillie A, Bataille C, Legrève A, Heick TM, Jørgensen LN, Andersson B, Samils B, Rodemann B, Berg G, Kildea S. 2020. Multiplex qPCR assay for simultaneous quantification of CYP51-S524T and SdhC-H152R substitutions in European populations of *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology*. 69: 1666-1677.

Higley LG, Peterson RKD. 1996. The biological basis of the EIL. En: Higley LG, Pedigo LP, editores. *Economic threshold for integrated pest management*. Lincoln, Estados Unidos: University of Nebraska Press. p. 22–40.

Hu W, Yan L, Ma Z. 2008. Cloning and expression analysis of a putative ABC transporter gene BgABC1 from the biotrophic pathogenic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Journal of Phytopathology*. 156:120–124.

Ishii H. 2012. Resistance to QoI and SDHI fungicides in Japan. En: Thind TS, Farrar N, Lainsbury A, Chippendale F, editores. *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management*. Wallingford, Reino Unido: CABI. p. 223.

Ishii H, Fountaine J, Chung W-H, Kansako M, Nishimura K, Takahashi K, Oshima M. 2009. Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Management Science*. 65:916–922.

Ishii H, Yano K, Date H, Furuta A, Sagehashi Y, Yamaguchi T, Sugiyama T, Nishimura K, Hasama W. 2007. Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens. *Phytopathology*. 97:1458-1466.

Kansako M, Yoneda Y, Shimadu K, Ishii H. 2005. Occurrence of strobilurin-resistant *Botrytis cinerea*, pathogen of citrus gray mold. *Japanese Journal of Phytopathology*. 71:249.

Karlsson Green K, Stenberg JA, Lankinen Å. 2020. Making sense of Integrated Pest Management (IPM) in the light of evolution. *Evolutionary Applications*. 13:1791-1805.

Kayamori M, Shimizu M, Yamana T, Komatsu T, S-Iketani M, Shinmura A, Sasaki J, Kozawa T, Notsu A, Yasuoka S. 2019. First report of QoI resistance in *Cercospora beticola* in sugar beet in Japan. *Journal of General Plant Pathology*. 86:149–153.

- Keinath AP, Rennberger G, Kousik CS. 2018. First report of resistance to boscalid in *Podosphaera xanthii*, cucurbit powdery mildew, in South Carolina. Plant Health Progress. 19:220–221.
- Kim JY, Hong SS, Lim JW, Park KY, Kim HG. 2008. Screening of fungicide resistance of cucumber powdery mildew pathogen, *Sphaerotheca fusca* in Gyeonggi province. Research in Plant Disease. 14:95–101.
- Kim YK, Xiao CL. 2011. Stability and fitness of pyraclostrobin- and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. Phytopathology. 101:1385-1391.
- Kogan M. 1998. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. Annual Review of Entomology. 43:243–270.
- Kretschmer M. 2012. Emergence of multi-drug resistance in fungal pathogens: a potential threat to fungicide performance in agriculture. En: Thind TS, editor. Fungicide resistance in crop protection: risk and management. Columbia, Canadá: CABI. p.251-267.
- Landschoot S, Carrette J, Vandecasteele M, De Baets B, Höfte M, Audenaert K, Haesaert G. 2017. Boscalid-resistance in *Alternaria alternata* and *Alternaria solani* populations: An emerging problem in Europe. Crop Protection. 92:49–59.
- Lebeda A, Sedláková B, Pejchar M, Jeřábková H. 2010. Variation for fungicide resistance among cucurbit powdery mildew populations in the Czech Republic. Acta Horticulturae. 871:465–476.
- Lee J, Elliott M, Kim M, Yamada T, Jung G. 2020. A rapid molecular detection system for SdhB and SdhC point mutations conferring differential SDHI resistance in populations of *Clariireedia* populations. Plant Disease. 105:660-666.
- Leroux P, Gredt M, Leroch M, Walker A-S. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. Applied and Environmental Microbiology. 76:6615–6630.
- Lesemann SS, Schimpke S, Dunemann F, Deising HB. 2006. Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome b gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. Journal of Plant Diseases and Protection. 113:259–266.

Li X, Fernández-Ortuño D, Chen S, Grabke A, Luo C-X, Bridges WC, Schnabel G. 2014. Location-specific fungicide resistance profiles and evidence for stepwise accumulation of resistance in *Botrytis cinerea*. Plant Disease. 98:1066-1074.

Lichtemberg PSF, Luo Y, Doussoulin H, Michailides TJ. 2018. Using Allele-specific PCR for detecting multiple amino acid substitutions associated with SDHI resistance in *Alternaria alternata* causing Alternaria late blight in pistachio. Letters in Applied Microbiology. 67:506-512.

López-Ruiz FJ, Pérez-García A, Fernández-Ortuño D, Romero D, García E, de Vicente A, Brown AKM, Torés JA. 2010. Sensitivities to DMI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. Pest Management Science. 66:801-808.

Luo Y, Hou L, Förster H, Adaskaveg JE. 2013. QoI resistance in *Fusicladium carpophilum* populations from almond in California and evaluation of molecular resistance mechanisms. Plant Disease. 97:1322-1330.

Ma Z, Michailides TJ. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection. 24:853-863.

Malathrakakis NE. 1986. Fungicide resistance in diseases of vegetables growing under plastic in Crete. EPPPO Bulletin. 16:429-435.

Mallik I, Arabiat S, Pasche JS, Bolton MD, Patel JS, Gudmestad NC. 2014. Molecular characterization and detection of mutations associated with resistance to succinate dehydrogenase-inhibiting fungicides in *Alternaria solani*. Phytopathology. 104:40-49.

Markoglou AN, Malandrakis AA, Vitoratos AG, Ziogas BN. 2006. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. European Journal of Plant Pathology. 115:149-162.

McGrath MT. 2013. Efficacy of fungicides with resistance risk for cucurbit powdery mildew and fungicide sensitivity of *Podosphaera xanthii* in New York (Abstr.). Phytopathology. 103.

McGrath MT. 2017. First report of resistance to quinoxifen in *Podosphaera xanthii*, causal agent of cucurbit powdery mildew, in the United States. Plant Health Progress. 18:94.

McGrath MT. 2008. Fungicide sensitivity in *Podosphaera xanthii* and efficacy for cucurbit powdery mildew in NY, USA, in 2003-2006. Journal Plant Pathology. 90:90.

McGrath MT, Sexton ZF. 2018. Poor control of cucurbit powdery mildew associated with first detection of resistance to cyflufenamid in the causal agent, *Podosphaera xanthii*, in the United States. *Plant Health Progress*. 19:222–223.

McGrath MT, Shishkoff N. 2003. First report of the cucurbit powdery mildew fungus (*Podosphaera xanthii*) resistant to strobilurin fungicides in the United States. *Plant Disease*. 87:1007.

McGrath MT, Shishkoff N. 2001. Resistance to triadimefon and benomyl: Dynamics and impact on managing cucurbit powdery mildew. *Plant Disease*. 85:147–154.

Metz N, Adolf B, Chaluppa N, Hückelhoven R, Hausladen H. 2019. Occurrence of *sdh* mutations in German *Alternaria solani* isolates and potential impact on boscalid sensitivity *in vitro*, in the greenhouse and in the field. *Plant Disease*. 103:3065-3071.

Miazzi M, McGrath MT. 2008. Sensitivity of *Podosphaera xanthii* to registered fungicides and experimental in GA and NY, USA, in 2007. *Journal Plant Pathology*. 90:90.

Mike A, Quesada-Ocampo LM. 2017. Evaluation of fungicides for control of powdery mildew of winter squash, Cleveland 2016. *Plant Disease Management Reports*. 11:112.

Miyamoto T, Hayashi K, Ogawara T. 2020. First report of the occurrence of multiple resistance to Flutianil and Pyriofenone in field isolates of *Podosphaera xanthii*, the causal fungus of cucumber powdery mildew. *European Journal of Plant Pathology*. 156:953–963.

Miyamoto T, Hayashi K, Okada R, Wari D, Ogawara T. 2020. Resistance to succinate dehydrogenase inhibitors in field isolates of *Podosphaera xanthii* on cucumber: Monitoring, cross-resistance patterns and molecular characterization. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 169:104646.

Miyamoto T, Ishii H, Tomita Y. 2010. Occurrence of boscalid resistance in cucumber powdery mildew in Japan and molecular characterization of the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase of the causal fungus. *Journal of General Plant Pathology*. 76:261–267.

Mosquera S, Chen L-H, Aegerter B, Miyao E, Salvucci A, Chang T-C, Epstein L, Stergiopoulos I. 2019. Cloning of the cytochrome b gene from the tomato powdery mildew fungus *Leveillula taurica* reveals high levels of allelic variation and heteroplasmy for the G143A mutation. *Frontiers in Microbiology*, 10:663.

Mostafanezhad H, Edin E, Grenville-Briggs LJ, Lankinen Å, Liljeroth E. 2022. Rapid emergence of boscalid resistance in Swedish populations of *Alternaria solani* revealed by a combination of field and laboratory experiments. *European Journal of Plant Pathology*. 162:289–303.

Moustafa MSH, Abd-el-Shahid YA, Ez-Eldin I, Anwar HM. 1990b. Factors affecting acquired resistance in *Erysiphe cichoracearum* the causal organism of cucumber powdery mildew. *Agricultural Research Review*. 68:521–528.

Moustafa MSH, Abd-el-Shahid YA, Ez-Eldin I, Anwar HM. 1990a. Occurrence of acquired resistance to fungicides in *Erysiphe cichoracearum*, the causal organism of cucumber powdery mildew. *Agricultural Research and Reviews*. 68:513–520.

Musson G, Young H, 2012. Status of fluopyram resistance development. *Phytopathology*. 102:S4.84.

O'Brien R, Vawdrey L, Glass R. 1988. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) and its effect on field control. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 28:417.

O'Brien RG. 1994. Fungicide resistance in populations of cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 22:145–149.

Ohtsuka N, Sou K, Amano T, Ojima M, Nakazawa Y, Yamada Y. 1988. Decreased sensitivity of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) to ergosterol biosynthesis inhibitors. *Japanese Journal of Phytopathology*. 54:629–632.

Omrane S, Audéon C, Ignace A, Duplaix C, Fillinger S. 2017. Plasticity of the MFS1 promoter leads to multidrug resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere*. 2:e00393-17.

Pedigo LP, Hutchins SSH, Higley LG. 1986. Economic injury levels in theory and practice. *Annual Review of Entomology*. 31:341–368

Pirondi A, Nanni IM, Brunelli A, Collina M. 2014. First report of resistance to cyflufenamid in *Podosphaera xanthii*, causal agent of powdery mildew, from melon and zucchini fields in Italy. *Plant Disease*. 98:1581–1581.

Popko Jr J, Sang H, Lee J, Yamada T, Hoshino Y, Jung G. 2018. Resistance of *Sclerotinia homoeocarpa* field isolates to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Plant Disease*. 102:2625-2631.

Rehfus A, Miessner S, Achenbach J, Strobel D, Bryson R, Stammer G. 2016. Emergence of succinate dehydrogenase inhibitor resistance of *Pyrenophora teres* in Europe. *Pest Management Science*. 72:1977–1988.

Roohparvar R, Waard MAD, Kema GHJ, Zwiers LH. 2007. MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology*. 44:378–388.

Ruprecht J, Yankovskaya V, Maklashina E, Iwata S, Cecchini G. 2009. Structure of *Escherichia coli* succinate:quinone oxidoreductase with an occupied and empty quinone-binding site. *Journal of Biological Chemistry*. 284:29836–29846.

Samaras A, Madesis P, Karaoglanidis GS. 2016. Detection of *sdhB* gene mutations in SDHI-resistant isolates of *Botrytis cinerea* using High Resolution Melting (HRM) analysis. *Frontiers in Microbiology*. 7:1815.

Sang H, Hulvey J, Popko JT, Lopes J, Swaminathan A, Chang T, Jung G. 2015. A pleiotropic drug resistance transporter is involved in reduced sensitivity to multiple fungicide classes in *Sclerotinia homoeocarpa*. *Molecular Plant Pathology*. 16:251-261.

Sang H, Hulvey JP, Green R, Xu H, Im J, Chang T, Jung G. 2018. A xenobiotic detoxification pathway through transcriptional regulation in filamentous fungi. *mBio*. 9:e00457-18.

Scalliet G, Bowler J, Luksch T, Kirchhofer-Allan L, Steinhauer D, Ward K, Niklaus M, Verras A, Csukai M, Daina A, Fonné-Pfister R. 2012. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE*. 7:e35429.

Secor GA, Rivera VV. 2011. Fungicide resistance assays for fungal plant pathogens. En: *Methods in Molecular Biology*. Nueva Jersey (EEUU): Springer. p. 385–392.

Sedláková B, Lebeda A. 2008. Fungicide resistance in Czech populations of cucurbit powdery mildews. *Phytoparasitica*. 36:272–289.

Sedláková B, Lebeda A, Jerabkova H, Paulik R, Vajdova M. 2012. Resistance to fenarimol, dinocap, benomyl, thiophanate-methyl and azoxystrobin in cucurbit powdery mildew populations in the Czech Republic. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*. 15:46–49.

Simões K, Hawlik A, Rehfus A, Gava F, Stammer G. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 125:21–26.

Stammer GA, Wolf A, Klaach K. 2015. Mechanisms of resistance. Respiration inhibitors: Complex II. En: Ishii H, Hollomon DW, editores. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Tokio, Japón: Springer. p. 104–117.

Stenberg JA. 2017. A conceptual framework for integrated pest management. *Trends in Plant Science*. 22:759–769.

Stergiopoulos I, Aoun N, van Huynh Q, Neill T, Lowder S, Newbold C, Cooper ML, Ding S, Moyer M, Miles TD, Oliver C, Urbez-Torres JR, Mahaffee WF. 2022. Identification of putative SDHI target-site mutations in the SDHB, SDHC, and SDHD subunits of the grape powdery mildew pathogen *Erysiphe necator*. *Plant Disease*. First look.

Steurbaut W. 1993. Adjuvants for use with foliar fungicides. *Pesticide Science*. 38:85-91.

Toffolatti SL, Serrati L, Sierotzki H, Gisi U, Vercesi A. 2007. Assessment of QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Management Science*. 63:194–201.

Torriani SF, Brunner PC, McDonald BA, Sierotzki H. 2009. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*. 65:155–162.

Veloukas T, Leroch M, Hahn M, Karaoglanidis GS. 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease*. 95:1302–1307.

Villani SM, Cox KD. 2014. Heteroplasmy of the cytochrome b gene in *Venturia inaequalis* and its involvement in quantitative and practical resistance to trifloxystrobin. *Phytopathology*. 104:945–953.

Weber RW, Entrop A-P, Goertz A, Mehl A. 2015. Status of sensitivity of Northern German *Botrytis* populations to the new SDHI fungicide fluopyram prior to its release as a commercial fungicide. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 122:81–90.

Yamashita M, Fraaije B. 2018. Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici*. *Pest Management Science*. 74:672–681.

Yin YN, Kim YK, Xiao CL. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology*. 101:986–995.

Zhu J, Zhang L, Li H, Gao Y, Mu W, Liu F. 2020. Development of a LAMP method for detecting the N75S mutant in SDHI-resistant *Corynespora cassiicola*. *Analytical Biochemistry*, 597:113687.

VI.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de este trabajo han sido las siguientes:

1. Los oídios han desarrollado resistencia a las familias de fungicidas económicamente más relevantes, siendo *P. xanthii* la especie que parece desarrollar resistencias con más facilidad.
2. Se han detectado aislados de *P. xanthii* con altos niveles de resistencia a los fungicidas SDHI boscalida y fluopiram en las principales zonas productoras del sureste de España, es por ello por lo que se recomienda la implantación de prácticas para el manejo de dichas resistencias.
3. La resistencia a SDHI en *P. xanthii* está relacionada con los cambios A86V y G151R en la subunidad C del complejo succinato deshidrogenasa, cambios que no parecen causar una penalización para la supervivencia en los aislados resistentes.
4. La heteroplasmia mitocondrial asociada al cambio G143A en citocromo b es la responsable de la resistencia a los fungicidas QoI en *P. xanthii*, resultando un fenotipo resistente cuando el porcentaje del alelo resistente supera el 70%.
5. La técnica del ARMS-qPCR permite la cuantificación de alelos del gen *cytb* silvestre y mutante resistente a QoI en *P. xanthii*, incluso cuando estos se encuentran en heteroplasmia.
6. La técnica LAMP es un método rápido y fiable para la detección de las mutaciones puntuales responsables de las resistencias a fungicidas MBC y SDHI en *P. xanthii*, pudiendo ser una buena herramienta molecular para incorporar en los programas de monitorización de resistencia del oídio de las cucurbitáceas.
7. En España, la resistencia a fungicidas en *P. xanthii* es un problema de importancia creciente, es por ello por lo que se deberían implantar estrategias de manejo de estas resistencias de forma urgente, especialmente en las áreas de cultivo intensivo.