



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

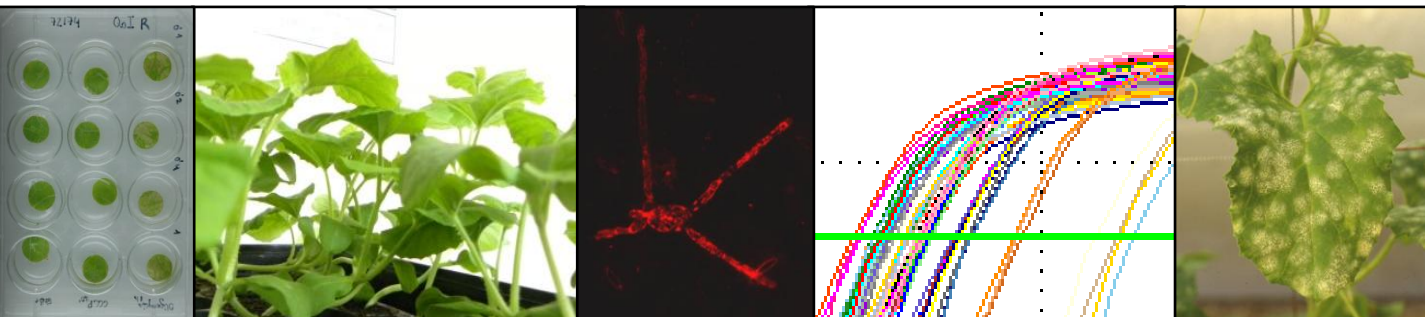


TESIS DOCTORAL

Nuevas Perspectivas Moleculares y Agronómicas de la Resistencia a Fungicidas en *Podosphaera fusca*

DAVINIA BELLÓN GÓMEZ

**Universidad de Málaga
2014**

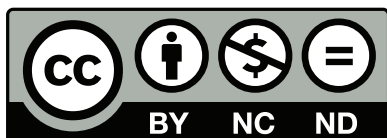




**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Davinia Bellón Gómez

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

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



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO FUNDAMENTOS CELULARES Y MOLECULARES DE LOS SERES VIVOS

TESIS DOCTORAL

Nuevas perspectivas moleculares y agronómicas de la resistencia a fungicidas en *Podosphaera fusca*

Memoria presentada por la licenciada en Biología

Davinia L. Bellón Gómez

para optar al grado de

Doctor en Biología

por la Universidad de Málaga

Directores:

Dr. Alejandro Pérez García

Dr. Juan Antonio Torés Montosa



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



Málaga, Mayo de 2014

La agricultura española posee una amplia diversidad productiva como resultado de las variadas condiciones climáticas y edáficas imperantes en las distintas zonas del territorio nacional. La familia de las cucurbitáceas es de gran importancia en España, ya que la cuarta parte de la producción total de hortalizas se debe a este cultivo. Habría que distinguir entre dos sistemas de producción: invernadero (realizado fundamentalmente en las zonas mediterráneas de la península) y al aire libre (en zonas del interior). Según el último avance del MAGRAMA, en 2012 la producción de cucurbitáceas representó más de 62 millones de hectáreas de cultivo, lo que se tradujo en un beneficio económico de más de 1.100 millones de euros. Casi la mitad de la producción se dedicó al cultivo del melón. Castilla-La Mancha fue la comunidad autónoma que presentó una mayor producción de este cultivo, siendo mayoritariamente su producción al aire libre, con unas 382 mil toneladas. Le sigue Murcia con una producción de 219 mil toneladas, produciéndose en invernadero en la primavera y al aire libre en verano. Andalucía ocupa el tercer puesto en producción de melón con 208 mil toneladas, donde más de la mitad se produjeron en Almería, cuya producción principal es en invernadero. En España también son importantes los cultivos de pepino, calabacín y sandía. Destaca Andalucía con producciones de 644.830 t de pepino (90% de la producción nacional), 337.721 t de calabacín (83,5% de la producción nacional) y 439.151 t de sandía (60% de la producción nacional).

Una limitación importante del cultivo de las cucurbitáceas es el desarrollo de enfermedades producidas por microorganismos, destacando las enfermedades de origen fúngico, que se ven favorecidas en cultivos de invernadero debido a que encuentran las condiciones óptimas para el avance de la enfermedad (menor intensidad de luz, humedad y ventilación restringida) (MacGrath y Shishkoff, 2000).

1. LOS OÍDIOS

Oídio es el término utilizado para designar tanto a la enfermedad como al agente causal. Los oídios son hongos cosmopolitas que se extienden a través de todos los climas del planeta. Es una enfermedad que afecta a más de 7600 especies de angiospermas, en 162 zonas geográficas distintas (Hirata, 1976). De hecho, es una de las enfermedades más antiguas datada en plantas, ya registrada por Linneo.

Los oídios se clasifican dentro de la división Ascomycota, Clase Leotiomycetes, subclase Leotiomycetidae, orden Erysiphales, familia Erysiphaceae (Braun *et al.*, 2002). Por el aspecto morfológico y la relación con el hospedador se dividió la familia Erysiphaceae en 900

especies que se engloban en 16 géneros diferentes, entre los cuales destacan *Podospaera*, *Blumeria*, *Golovinomyces*, *Uncinula*, *Erysiphe*, y *Leveillula* (Braun and Cook, 2012). Las especies del orden Erysiphales son los Ascomycetos de mayor importancia económica. En la actualidad, mediante técnicas basadas en el análisis de las secuencias espaciadoras transcritas internas del ADN ribosómico o ITS (Internal Transcribed Spacer), se han definido con mayor precisión las relaciones filogenéticas entre los diferentes géneros y especies de oídio, y de esta forma se ha observado una gran similitud entre los géneros *Sphaerotheca* y *Podospaera*, así que se ha propuesto su unión bajo el nombre de *Podospaera* (Braun *et al.*, 2002).

Para el desarrollo de la enfermedad se necesita la interacción compatible entre oídio y la planta huésped. Esta interacción depende de la llegada del conidio, adherencia, reconocimiento, penetración, proliferación, nutrición y supresión de las defensas del huésped (Spanu, 2006). Para mantener el ciclo de vida parasitario obligatorio, los oídios han desarrollado mecanismos altamente específicos y sofisticados para obtener los nutrientes desde el hospedador sin lesionar sus células, denominados haustorios (Bushnell y Gay, 1978). Como resultado natural, la mayoría de oídios presentan una estricta especificidad de huésped, gracias a la cual una determinada especie o raza puede infectar y utilizar una estrecha gama de huéspedes, o a veces solamente una especie particular de hospedador (Schmitt, 1955). Así, los diferentes géneros de oídio causan la enfermedad en diferentes plantas (p.e. *Erysiphe* infecta cultivos hortícolas y vides, mientras que *Podospaera* infecta bayas, rosas, frutales de pepita y hueso y algunas hortalizas).

Los oídios son hongos biotrofos, por lo que necesitan de plantas vivas para su desarrollo y no pueden ser cultivados axénicamente. Además son hongos epifitos cuyo micelio se distribuye por la superficie de hospedador, únicamente los haustorios penetran en las células epidérmicas no fotosintéticas de la planta infectada.

1.1. El oídio de las cucurbitáceas

El oídio de las cucurbitáceas ha sido descrito como una de las principales enfermedades que afecta a estos cultivos en todo el mundo, causando graves pérdidas, tanto en condiciones de aire libre como de invernadero. La importancia económica de la enfermedad está aumentando rápidamente en zonas de clima templado como la cuenca mediterránea. La reducción de la calidad del fruto, daño de los cultivos y el aumento en los costes de producción son los aspectos más llamativos de la enfermedad (del Pino *et al.*, 2002). La enfermedad puede producir daños del 50-100% de la cosecha (Leonard y Gianessi, 2005) pudiendo ser causada

por *Podosphaera fusca* (Fr.) Braun & Shishkoff (sin.: *Sphaerotheca fusca*, *Podosphaera xanthii*) o *Golovinomyces cichoracearum* (DC) Gelyuta (sin.: *Erysiphe cichoracearum*) que aunque inducen síntomas idénticos pueden distinguirse fácilmente al microscopio óptico (Braun *et al.*, 2002). Desde hace más de 20 años en las provincias de Almería y Málaga y después en las provincias de Badajoz, Ciudad Real, Córdoba, Murcia, Sevilla y Valencia, *P. fusca* ha sido identificado como el único agente causante del oídio en cucurbitáceas (del Pino *et al.*, 2002), al igual que ocurre en el norte de África, Israel y EEUU. Sin embargo, en otros países de Europa como Italia y Francia, las dos especies coexisten (Bardin *et al.*, 1999).

1.1.1. Síntomas de la enfermedad

La capacidad de desarrollo del oídio depende de factores abióticos como la temperatura, humedad relativa o iluminación y de factores bióticos como la edad de la hoja o susceptibilidad del huésped.

La temperatura óptima para el desarrollo de *P. fusca* en cultivos de melón oscila entre 20 y 27 °C, aunque la infección puede ocurrir entre 10 y 32 °C (Álvarez, 1993; Zitter *et al.*, 1996). El número de conidios formados varía poco con la temperatura y está alrededor de 800 conidios/mm². La humedad relativa óptima para la germinación de los conidios es del 100 % y conforme ésta descende también baja la tasa de germinación (Álvarez, 1993). La duración del periodo de iluminación también influye; con un fotoperiodo de 12 h la tasa de crecimiento miceliar, el número de conidios, y el área de la colonia, son mayores que con la luz u oscuridad continuas (Álvarez, 1993).

Aunque no se ha descrito patogenicidad huésped-específica en el oídio de las cucurbitáceas cultivadas, sí existen patotipos capaces de atacar sólo a determinadas especies de esta familia botánica. En España se han encontrado estirpes de *P. fusca* capaces de infectar: i) calabacín y melón; ii) calabacín, melón y pepino; iii) calabacín, melón y sandía; y iv) calabacín, melón, pepino y sandía (del Pino *et al.*, 2002).

Los síntomas iniciales de la enfermedad se caracterizan por la aparición de manchas redondeadas de color blanquecino y aspecto pulverulento que se pueden formar en ambas superficies de la hoja, en brotes, tallo y muy raramente en flores y frutos (Sitterly, 1978) (Fig. 1A). Estos síntomas se presentan a los cinco o seis días después de la inoculación. Bajo condiciones favorables iniciales las manchas gradualmente se extienden sobre un área grande de las hojas y tallos (Fig. 1C). Las hojas fuertemente infectadas con oídio presentan clorosis y finalmente se secan, provocando la senescencia temprana de la planta. La pérdida de follaje de forma precipitada provoca malformaciones, quemaduras y deformaciones del fruto. Esta

enfermedad también provoca reducciones de la tasa fotosintética de la planta, por lo que disminuye el contenido de azúcar en el fruto, afectando así a su sabor. Este se traduce en reducciones en la cantidad, calidad y tamaño de los frutos (Zitter *et al.*, 1996).

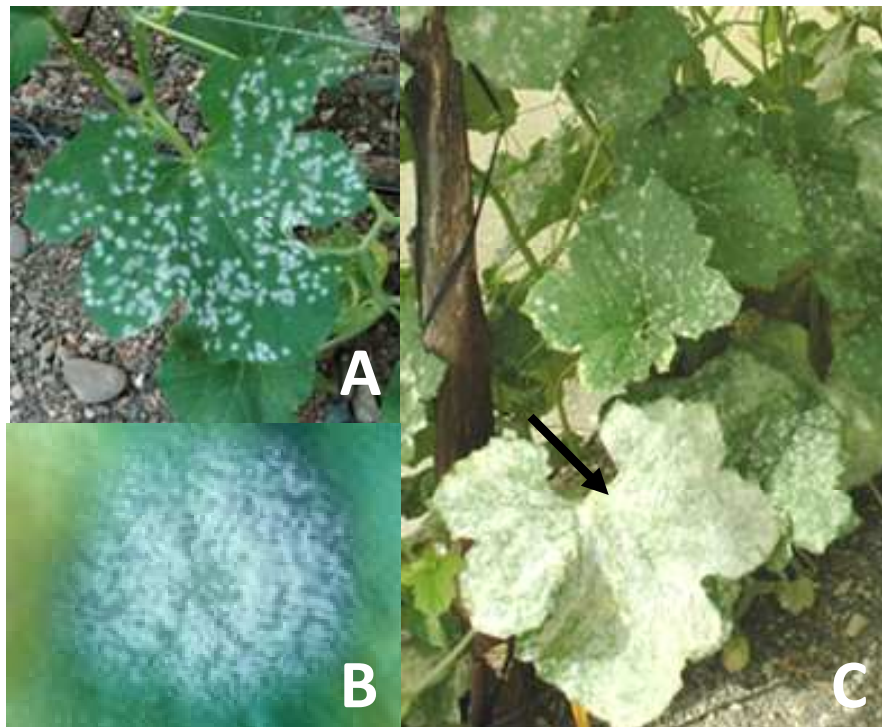


Figura 1. Síntomas de *Podosphaera fusca* infectando hojas de melón en un invernadero. **A**, Pequeñas manchas blancas redondeadas indican el comienzo de la enfermedad. **B**, Detalle de una colonia. **C**, La flecha negra indica síntomas avanzados de la enfermedad.

1.1.2. Ciclo de vida y epidemiología

El ciclo reproductivo asexual o anamorfo se caracteriza por una esporulación vegetativa y la producción de esporas haploides asexuales o conidios. Esta fase comienza cuando un conidio se deposita sobre una planta huésped susceptible y germina. La espora produce un tubo germinativo observable entre las 6 y 8 h después de la inoculación, que termina en un apresorio indiferenciado desde el que se forma una hifa de penetración y haustorio subsiguiente. Desde este tubo germinativo o desde la espora se forma una hifa primaria que origina un segundo apresorio y haustorio, proceso que ocurre entre las 24 y 48 h de la inoculación. Después, las hifas se ramifican para formar hifas secundarias a las 72h, generando un micelio blanquecino sobre la planta. Los conidióforos se desarrollan a partir de

algunas hifas secundarias y en ellos se originan las conidias dispuestas en cadena, completándose así el ciclo asexual en 4 a 5 días después de la inoculación (Pérez-García *et al.*, 2001). Los conidios de *P. fusca* tienen forma elíptica y presentan en su interior cuerpos de fibrosina (estructuras citoplasmáticas con aspecto de bastoncillos que a veces se anastomosan en forma de L o V y que se hacen más visibles con un tratamiento de KOH al 3%). Los tubos germinativos se forman lateralmente (Fig. 2.1.C y 2.2), a diferencia de *G. cichoracearum* cuyos conidios tienen forma cilíndrica, no presentan cuerpos de fibrosina y el tubo germinativo se forma apicalmente (Braun *et al.*, 2002; Glawe, 2008).

Bajo determinadas condiciones de temperatura, fotoperiodo e intensidad de luz, estos hongos pueden iniciar la fase de reproducción sexual de su ciclo de vida. *P. fusca* es un hongo heterotálico, por lo que es imprescindible el encuentro de dos cepas con tipos de compatibilidad sexual diferentes; la unión de un anteridio y un ascogonio daría lugar a la formación de un cuerpo fructífero denominado casmotecio, que contiene ocho ascosporas haploides sexuales o esporas sexuales (Braun *et al.*, 2002) (Fig. 2.1.D-E y 2.2). Cuando las condiciones son favorables, el asca aumenta de tamaño, debido al aumento de la presión de agua, rompiendo así la pared del casmotecio y liberando las ascosporas sexuales al aire (Ridout, 2009). En *P. fusca*, los casmotecios contienen una sola asca con ocho ascosporas, mientras que en *G. cichoracearum* contienen numerosas ascas con dos ascosporas. La formación del casmotecio ocurre con mayor frecuencia al final de la temporada de crecimiento cuando se reduce la cantidad de tejido foliar verde. Las ascosporas permanecen latentes durante todo el invierno para germinar en primavera. Una vez que estas esporas germinan en una hoja de huésped susceptible un nuevo ciclo de la enfermedad comienza. En *P. fusca*, los casmotecios rara vez se han observado en las principales áreas de producción de cucurbitáceas (McGrath, 1994), por lo que la importancia epidemiológica de la fase sexual de este patógeno aún no ha sido aclarada (Pérez-García *et al.*, 2009).

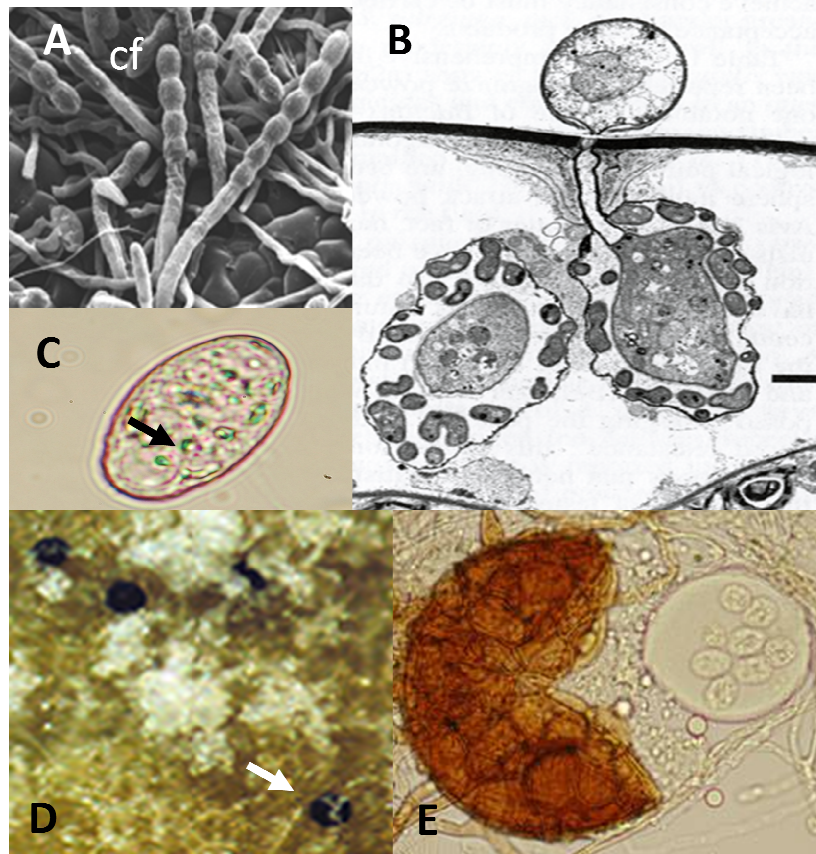


Figura 2.1. *Podosphaera fusca* en imágenes. **A:** Microfotografías con microscopio electrónico de barrido de una colonia mostrando el desarrollo de los tubos germinativos y la formación de conidióforos (cf). **B:** Micrografía electrónica de transmisión mostrando la morfología del haustorio. **C:** Cuerpos de fibrosina en el interior de un conidio (flecha). **D:** Producción de casmotecios (flecha) tras el encuentro de dos cepas con diferentes tipos de compatibilidad sexual. **E:** Casmotecio maduro mostrando una única asca con ocho ascosporas.

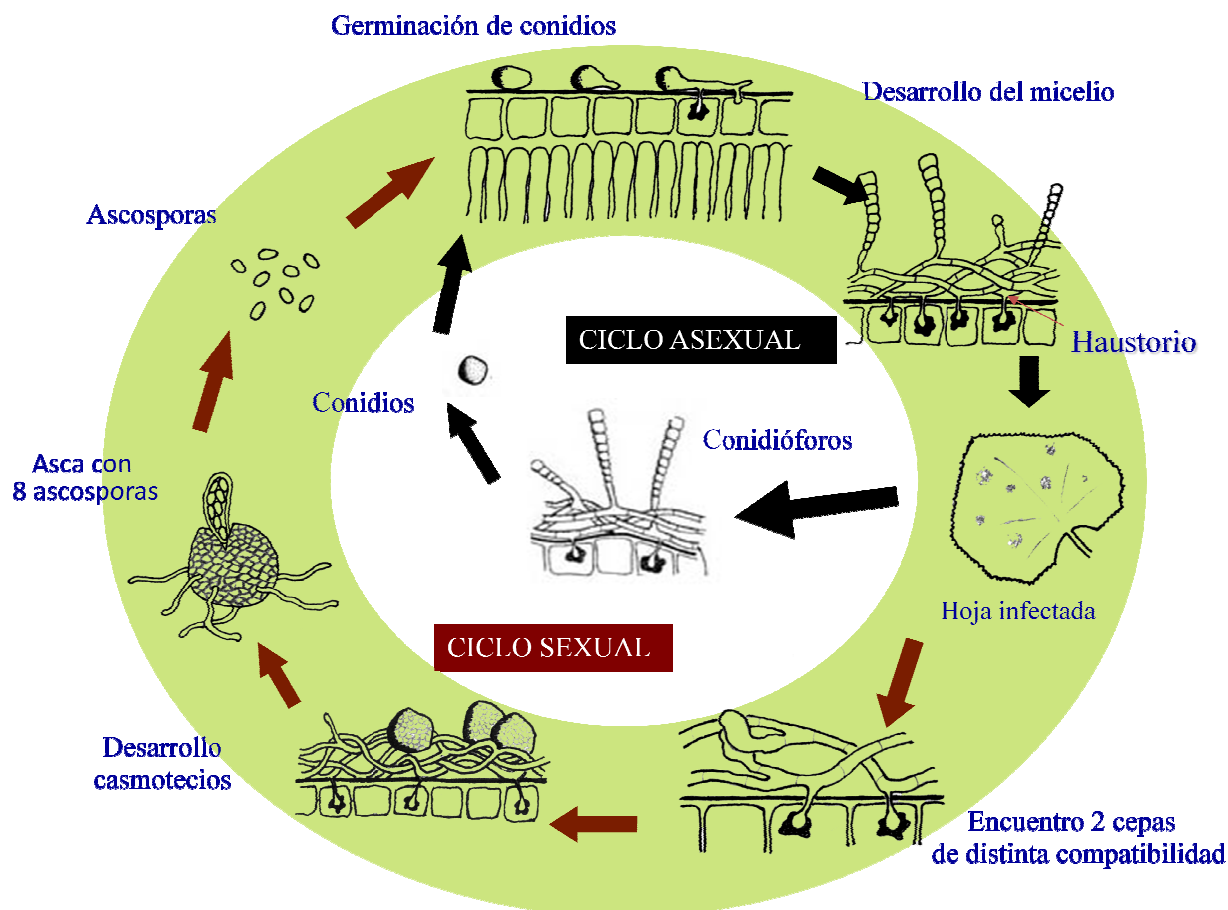


Figura 2.2. Esquema del ciclo de vida de *Podosphaera fusca*.

2. CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Las prácticas culturales, junto con el uso de cultivares resistentes, organismos antagonistas y fungicidas, son las principales herramientas para el control de la enfermedad. El control por mejora genética se realiza a través del empleo de cultivares resistentes, el control con medidas biológicas mediante la utilización de organismos antagonistas y el control químico, con el uso de fungicidas. Las condiciones de suelo, nutrición, densidad del cultivo, saneamiento y rotación de cultivos influyen en la intensidad de la infección por oídio (Ridout, 2009). En la actualidad se desarrollan estrategias de control integrado que combinan todas estas herramientas.

2.1. Control por mejora genética

El uso de la mejora genética como estrategia de control de los oídios es un hecho generalizado, ya que mejora el rendimiento de los cultivos y disminuye la frecuencia de

aplicación de fungicida. El uso de variedades resistentes no garantiza un cultivo libre de oídio, simplemente retrasa su aparición, ya que la introducción de un cultivar resistente se traduce en una presión de selección sobre el patógeno que trae como consecuencia la prevalencia de los biotipos del mismo capaces de superar esa resistencia.

El uso de variedades de cucurbitáceas resistentes al oídio se remonta a 1932 con la introducción de una variedad resistente de melón (*Cucumis melo*) (Jahn *et al.*, 2002). Todos los genes de resistencia a oídio de cucurbitáceas de las variedades europeas, japonesas y americanas proceden de la India, uno de los lugares donde el melón es originario. La resistencia de estas variedades al oídio es monogénica y puede ser dominante o recesiva (Hückelhoven, 2005), aunque en la mayoría de los casos suele ser dominante (Jahn *et al.*, 2002). Esta resistencia monogénica se denomina cualitativa o específica de raza, es decir, que es efectiva únicamente frente a determinadas cepas del patógeno. Este tipo de resistencia es vencida fácilmente por el hongo, siendo efectiva durante unos 2 a 5 años (Torés y Álvarez, 1994). Se identificaron varios cultivares de melón que conferían resistencia frente al oídio, lo que permitió la clasificación del patógeno en 7 razas principales; razas 0, 1, 2 americana, 2 europea, 3, 4 y 5. Posteriormente se han descrito 28 razas en melón, 8 derivadas de la raza 1 y 6 variantes de la raza 2 (McCreight, 2006).

En pepino (*Cucumis sativus*) al igual que en melón, la resistencia procede de diferentes países asiáticos entre los que podemos destacar Japón, China e India, lo que ha dado lugar al desarrollo de numerosos cultivares comerciales resistentes a oídio (Jahn *et al.*, 2002). En contraste, en la resistencia a oídio en pepino están involucrados varios genes recesivos ligados (Shanmugasundaram *et al.*, 1971), lo cual no conlleva una resistencia absoluta, pero sí más duradera (Torés y Álvarez, 1994). Esta resistencia se le denomina parcial o cuantitativa, ya que se basa en un conjunto de genes. Esta resistencia no confiere a la planta una protección total frente al patógeno pero permite disminuir la tasa de desarrollo y severidad de la enfermedad. No obstante la resistencia cualitativa se emplea más en programas de mejora genética que la cuantitativa, ya que es más fácil de incorporar en los genotipos de variedades agrónomicamente interesantes. El empleo de esquemas de diversificación varietal, tanto de las variedades resistentes de un tipo como de otro, se perfila como uno de los mejores aliados a la hora de impedir que los cultivos resistentes dejen de ser efectivos tan rápidamente y sea necesaria la introducción de nuevas variedades año tras año y con resultados cada vez menos satisfactorios (Wolfe, 1991).

El calabacín (*Cucurbita pepo*) es una especie originaria de América, donde el oídio supone un gran problema en la producción. Aunque en los catálogos de semillas existen cultivares

resistentes, la historia y el esfuerzo realizado no ha sido tan exitoso como en melón. Esto es en parte debido a que las fuentes de resistencia a oídio en calabacín no se han identificado en las especies cultivadas y han tenido que buscarse en especies silvestres que son sólo parcialmente compatibles con las especies domesticadas (Jahn *et al.*, 2002).

Entre los cultivares comerciales actuales en España, aparecen cultivares de melón, pepino y calabacín con resistencia a *P. fusca* (Marín Rodríguez, 2013). Los cultivos de sandía se han considerado tradicionalmente tolerantes a la enfermedad (Torés y Álvarez, 1994; Zitter *et al.*, 1996) aunque se han descrito ataques frecuentes en estos cultivos que hace suponer que el oídio está convirtiéndose en una enfermedad importante (del Pino *et al.*, 2002).

El aumento en los últimos años de estudios sobre la interacción entre el patógeno y el huésped ha permitido proponer una estrategia alternativa para la obtención de variedades resistentes mediante el silenciamiento de genes que confieren susceptibilidad. Estas estrategias podrían ser más duraderas y de amplio espectro, ya que se asemejan más a la resistencia no huésped, aunque es necesario evaluar las consecuencias que podría tener el silenciamiento de estos genes en la calidad y cantidad del fruto (Pavan *et al.*, 2010).

2.2. Control biológico

El control biológico se define como el empleo de organismos vivos como bacterias, hongos, nematodos o insectos para el control de plagas o enfermedades de los cultivos de plantas (Ehlers, 2011). Este tipo de control se basa en frenar el desarrollo del patógeno causante de la enfermedad mediante el empleo de agentes que ejercen una acción antagonista sobre el patógeno. Pueden actuar mediante interacciones medioambientales como la antibiosis, competencia por nutrientes o espacio, de forma directa mediante el parasitismo, depredación o la producción de antibióticos, o bien de forma indirecta mediante la inducción de las defensas de la planta (Lucas, 1998).

Los oídios presentan un ciclo de vida ectoparasitario, por lo que los agentes de control biológico que presentan mecanismos de acción basados en el parasitismo, antibiosis o inducción de resistencia sistémica podrían ser eficaces (Pauliz y Bélanger, 2001). En la actualidad se han descrito un número importante de hongos y bacterias potencialmente capaces de controlar el desarrollo del oídio a través de diversos mecanismos de acción. Solo algunos de ellos han mostrado una eficacia significativa, de manera que en el mercado únicamente existen 5 productos registrados para el oídio de las cucurbitáceas. Serenade® (Highland, 2000) compuesto por la bacteria *Bacillus subtilis* QWT713, que presenta una gran capacidad antagonista ejerciendo su acción biocontrol mediante la producción de sustancias

antifúngicas (lipopéptidos). AQ10® (Sztejnberg *et al.*, 1989) y Mycotal ® (Askary *et al.*, 1998) son preparados de esporas de los hongos micoparasitarios *Ampelomyces quisqualis* y *Lecanicillium lecanii* respectivamente, que inhiben eficazmente el crecimiento del hongo penetrando sus hifas en el huésped, y destruyendo así los tejidos. Trichodex® (Elad *et al.*, 2004) es un preparado a base de esporas del hongo *Trichoderma harzianum* T-39, actúa provocando un desplazamiento competitivo por los nutrientes y el espacio en las superficies de las plantas. Por último, el preparado comercial Sporodex® (Jarvis *et al.*, 1989), compuesto por la levadura *Pseudozyma flocculosa* que produce sustancias antifúngicas como ácidos grasos y otros metabolitos secundarios, que provocan la plasmólisis del micelio. En el mercado español sólo están registrados 3 productos para el oídio de las cucurbitáceas: Serenade®, AQ10® y Mycotal® (Marín Rodríguez, 2013).

El principal inconveniente que presentan los agentes de control biológico es que necesitan de unas condiciones ambientales muy concretas para la germinación de las esporas (tanto fúngicas como endosporas bacterianas) e iniciar su desarrollo para que puedan llevar a cabo su acción.

2.3. Control químico

Hasta ahora, el uso extensivo de fungicidas es la principal estrategia de control del oídio de las cucurbitáceas (McGrath, 2001), ya que al ser hongos que se desarrollan externamente sobre la superficie de la planta el fungicida entra fácilmente en contacto directo con las hifas actuando así con gran eficacia. Muchas razones pueden explicar esta estrategia, la parte práctica, ecológica y económica, pero el factor más importante es sin duda el alto nivel de eficacia de los fungicidas (Bélanger y Labbé, 2002). Desde finales de los años 70 el control de *P. fusca* en España ha dependido principalmente de la aplicación programada de fungicidas. Actualmente el uso de fungicidas persiste como principal estrategia de control, lo que se refleja en incrementos del 13% desde 2009 hasta 2011 en sus ventas (Anónimo, 2013a). No obstante, frecuentemente se desarrollan resistencias a estos compuestos.

Por su modo de acción, los fungicidas se pueden dividir en dos grandes grupos, los llamados fungicidas de contacto y los denominados fungicidas sistémicos (Lucas, 1998).

Los fungicidas de contacto se caracterizan por ser altamente tóxicos y por tanto afectan de forma muy negativa al medio ambiente. Actúan directamente en distintos puntos del patógeno, de modo que son muy efectivos como protectores en los puntos de entrada de éste. Al tener distintos puntos de actuación (inhibidores multisitio), el riesgo de aparición de resistencia a estos compuestos es bajo. Entre ellos destaca el azufre (fue el primer fungicida

utilizado para el control de oídio), los dinitrofenoles y el quinometionato (actualmente no son utilizados). Aunque su uso ha evolucionado, el azufre sigue registrado contra el oídio de las cucurbitáceas, en muchas zonas del mundo, al igual que en España. El inconveniente es que tiene un gran impacto residual, ya que su toxicidad elimina una gran parte de la microfauna útil y provoca problemas de toxicidad en el cultivo.

Los fungicidas sistémicos, también llamados curativos, son absorbidos por la planta y transportados internamente a otras partes de la misma, siendo inocuos para ésta y actuando de forma específica en los hongos. Son fungicidas que protegen y previenen, al mismo tiempo que erradican la enfermedad. Estas características son muy útiles, por lo que el control de la enfermedad se volcó casi por completo en el uso continuado de estas materias. Son compuestos muy específicos que suelen afectar a puntos concretos de una determinada ruta metabólica o función fisiológica, por ello la aparición de resistencia del patógeno a este tipo de compuestos químicos es muy frecuente. Sin embargo actualmente los fungicidas sistémicos son los más utilizados (Anónimo, 2013b). A comienzos de los años 60 y 70 surgen los MBC (Methyl-Benzimidazol Carbamates), pirimidinas, morfolinas y los fungicidas DMI (DeMethylation Inhibitors) en el grupo de los fungicidas IBE (Inhibidores de la Biosíntesis del Ergosterol) o SBI por sus siglas en inglés (Sterol Biosynthesis Inhibitors) (Russell, 2005). Posteriormente sobre los años 90 aparecen los inhibidores de la respiración mitocondrial (QoI: Quinone outsite Inhibitors) (Bartlett *et al.*, 2002), y con posterioridad, en 1994, el quinoxyfen dentro del grupo de los AZN (AZaNaftalenes) (Green and Gustafson, 2006). Además, la constante introducción de nuevas materias activas ofrece oportunidades para la gestión de la resistencia más eficaz. P.e. Metrafenona (de mecanismo desconocido, se supone que actúa alterando la síntesis de la actina) o Dimetomorf y Armicarb, que se introdujeron en el registro de productos sanitarios contra el oídio de las cucurbitáceas, el pasado año 2013 (Anónimo, 2014).

Un problema importante del empleo de fungicidas, es que tras su uso continuado pueden aparecer genotipos del patógeno resistentes, incluso cuando se utilizan productos de amplio espectro. En España se han observado diferentes grados de resistencia a algunos de estos fungicidas. En provincias de Almería, Valencia y Badajoz se observó una baja frecuencia de resistencia a fungicidas QoI, sin embargo en Ciudad Real, Córdoba y Murcia, la frecuencia resultó ser muy elevada. Además parece que esta resistencia es de tipo cualitativo, es decir, cambios genéticos en el hongo hacen que el aislado sea completamente resistente al fungicida, presentando una resistencia cruzada a todo el grupo de QoI (Fernández-Ortuño *et al.*, 2006). Este estudio también se realizó con fungicidas DMI. En este caso resultó ser una

resistencia cuantitativa, por lo que el rango de sensibilidad al fungicida depende del número de cambios genéticos acumulados. En las provincias de Ciudad Real, Córdoba y Valencia se observaron valores de resistencia a fungicidas DMI relativamente bajos, sin embargo en Almería estos valores fueron muy elevados. Aunque algunas materias activas pertenecientes al grupo de los fungicidas DMI continúan siendo útiles, se han identificado cepas resistentes a estos fungicidas en España (López-Ruiz *et al.*, 2010). Estos datos reflejan la problemática de la resistencia a fungicidas de *P. fusca* en España.

En la actualidad en España existen 41 materias activas autorizadas contra diferentes oídios en el Registro de Productos Fitosanitarios (Anónimo, 2014), de las cuales 33 pueden utilizarse solas (o mezcladas entre ellas), mientras que las ocho restantes se emplean exclusivamente en mezclas con las anteriores. Contra *P. fusca* están autorizados el uso de 14 materias activas, y no en todos los cultivos, lo cual limita mucho el número de mecanismos de acción que pueden emplearse, especialmente en invernadero, ya que en estas condiciones las cucurbitáceas son muy sensibles a daños por fitotoxicidad. Entre estas materias activas destacan las pertenecen al grupo de los fungicidas QoI, del resto de materias activas autorizadas, casi la mitad presentan idéntico mecanismo de acción, englobándose dentro del grupo de fungicidas DMI. Los QoI y los DMI son los grupos de fungicidas específicos más representativos y simbolizan aproximadamente la mitad del total de ventas mundiales en fungicidas.

3. FUNGICIDAS QoI

Los fungicidas QoI son un importante grupo de fungicidas que actúan inhibiendo la cadena respiratoria de las mitocondrias. Dentro del grupo de fungicidas QoI se incluyen las estrobilurinas (clase más importante), la fenamidona y la famoxadona, que aunque no poseen la misma estructura química que las estrobilurinas, poseen el mismo mecanismo de acción. Los QoI son fungicidas de amplio uso agrícola, de origen natural y derivados del ácido β -metoxiacrílico, como la estrobilurina A producida por hongos basidiomicetos como *Strobilurus tenacellus*, *Mycena galopoda* y *M. viridimarginata* (Gisi *et al.*, 2002). Las estrobilurinas representan el mayor desarrollo de fungicidas realizado a partir de un producto natural de origen fúngico. Basándose en el compuesto originario, en la actualidad se distinguen 8 clases de fungicidas QoI, todos con el mismo mecanismo de acción, que incluyen 13 compuestos diferentes (Fernández-Ortuño *et al.*, 2010). Las estrobilurinas fueron aisladas por primera en Checoslovaquia en los años 60, aunque fue en los años 80 cuando ICI Agrochemicals (actualmente Syngenta) empezó a sintetizarlas y experimentar hasta lanzar al

mercado el azoxistrobin en 1992. Desde entonces se han incluido dentro de los fungicidas agrícolas más vendidos en todo el mundo, con ventas anuales de más de 11 billones de dólares en 2010 (Anónimo, 2011). Actualmente, en España sólo existen tres fungicidas QoI (estrobilurinas) registrados contra el oídio de las cucurbitáceas. Estas materias activas son; azoxistrobin, kresoxim-metil y trifloxistrobin (Anónimo, 2014). Desde su aparición, los fungicidas QoI han sido utilizados contra grupos importantes de hongos y oomicetos fitopatógenos para el control de diversas enfermedades en frutales de hueso y pepita, vid, cereales y cultivos hortícolas (Barlett *et al.*, 2002). Sin embargo, no todos poseen la misma actividad frente a las diferentes enfermedades, ni el mismo control sobre los distintos patógenos. Por ejemplo kresoxim-metil y trifloxistrobin poseen una moderada actividad frente a algunas enfermedades producidas por oomicetos y baja actividad sobre el control de ciertas enfermedades producidas por basidiomicetos (Sauter *et al.*, 1999). Los fungicidas QoI solo son absorbidos por la planta en una proporción relativamente baja y tienen una acción translaminar, extendiéndose en las hojas en su mayor parte en el sentido acrópeto lento. Al aplicarse sobre el patógeno actúan sobre su micelio, por ello poseen efectos preventivos, curativos y erradicadores, así como un prolongado efecto residual (Barlett *et al.*, 2002).

3.1. Mecanismos de acción

El mecanismo de acción de los fungicidas QoI se basa en la inhibición de la respiración mitocondrial, actuando en el sitio de oxidación del ubiquinol (Qo) (Fig. 3. 1), de ahí que se conozcan con el nombre de inhibidores Qo (QoI). Este Qo se encuentra en el citocromo *bc₁* (*CYTBC₁*), también conocido como complejo III o ubiquinona–citocromo c oxidorreductasa (Gisi *et al.*, 2002) (Fig. 3.2). El *CYTBC₁* está formado por el citocromo *b* (*CYTB*), citocromo *c₁* (*CYTC₁*) y dominios de la sulfo-proteína de Rieske (*ISP*).

La inhibición de la respiración mitocondrial se logra mediante el bloqueo del transporte de electrones entre el citocromo *b* (*CYTB*) y citocromo *c₁* (*CYTC₁*), que en consecuencia conduce a una interrupción del ciclo de energía suspendiendo la producción de ATP, que constituye el principal vector de intercambio energético para los procesos vitales de la célula (Anke, 1995) (Fig. 3.1). Ello conlleva a la detención de funciones básicas celulares como la síntesis de proteínas, ARN y ADN debido a la deficiencia en ATP. Esta deficiencia es especialmente importante en organismos como *P. fusca* que necesitan de una enorme cantidad de ATP durante las primeras etapas de la germinación de su espora. Dependiendo del patógeno, el fungicida puede actuar sobre una o más fases del ciclo vital del organismo. Se observan inhibiciones en las fases tempranas como la germinación de la espora, y así

mismo una marcada sensibilidad en fases avanzadas del desarrollo, como es la formación del haustorio o desarrollo superficial. Además, el bloqueo de la respiración genera electrones en estado de alta energía que provocan una rápida aparición de especies reactivas de oxígeno, que hacen que los fungicidas QoI tengan mucha eficacia (Hollomon y Wheeler, 2002).

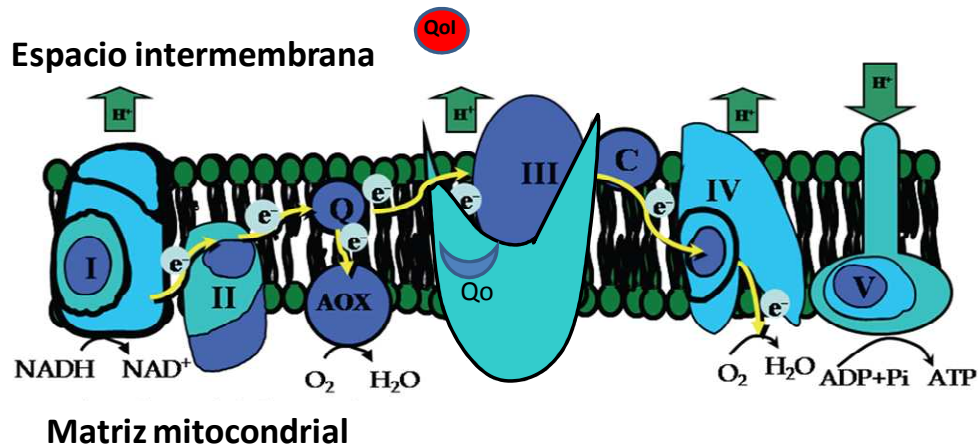


Figura 3.1. Cadena de transporte electrónico mitocondrial. Cuando los fungicidas QoI actúan sobre su diana (centro Qo del complejo III), se bloquea el transporte de electrones y protones a través de los complejos vecinos y por tanto la síntesis de ATP. Adaptado de Fernández-Ortuño *et al.*, 2008b.

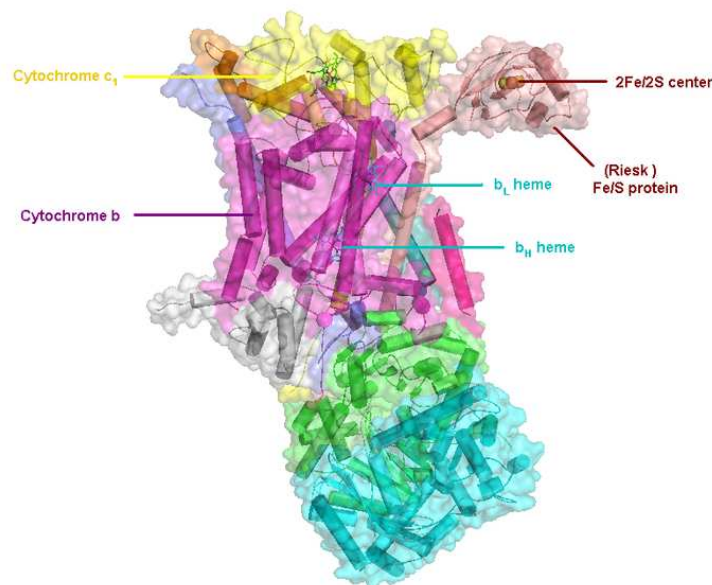


Figura 3.2. Estructura del citocromo bc_1 (también conocido como complejo III o ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa), sitio de oxidación del ubiquinol o Qo (quinone outside). Complejo compuesto por el citocromo b (cytochrome b), citocromo c_1 (cytochrome c_1) y dominios de la sulfoproteína de Rieske (2FE/2S-center, b_H y b_L heme y Fe/S protein). La zona no marcada es la parte más interna del complejo III es conocida como Qi (quinone inside). Creado por Pymol, adaptado de C31004 en Wikipedia.

4. FUNGICIDAS DMI

Los fungicidas DMI son fungicidas pertenecientes al grupo de fungicidas SBI, inhibidores de la síntesis de ergosterol. El ergosterol es el esteroide predominante en las membranas plasmáticas de la mayoría de los hongos y responsable de funciones estructurales y fisiológicas importantes de la célula (Benveniste, 2004). Dentro de los fungicidas DMI, los azoles representan el grupo más grande e importante de agentes antimicóticos que ha estado disponible desde mediados de la década de los 60 y que actualmente constituye una cuarta parte del mercado mundial de fungicidas (Anónimo, 2013c). En la actualidad se distinguen 6 grupos de fungicidas DMI, que componen un total de 36 materias activas, clasificadas en función de los nitrógenos del azol y las diferencias en las cadenas laterales (Hof, 2001). Entre estos grupos cabe destacar los triazoles (p.e. triadimenol y miclobutanil), imidazoles, piridinas y pirimidinas. En España la mayoría de estos fungicidas DMI están autorizados para su uso frente al oídio de las cucurbitáceas (Anónimo, 2014).

Los fungicidas DMI también tienen un amplio espectro de actividad contra la mayoría de levaduras y hongos filamentosos patógenos de plantas. Son utilizados contra mildius, tizones, royas y oídios. Controlan enfermedades en cereales, vides, hortalizas, arbustos y árboles. Son fungicidas sistémicos con una actividad protectora y curativa en el control de la enfermedad, así no sólo se aplican en la prevención de la infección de la planta, sino también para el tratamiento. Además tienen una baja toxicidad para los mamíferos y por lo tanto son utilizados como antimicóticos también en el reino animal para la infección por hongos y levaduras (Terrell, 1999). Esto hace que sean fungicidas de especial importancia en los estudios de resistencias.

4.1. Mecanismos de acción

Estos compuestos tienen una única diana bioquímica, la esteroide C14 α -demetilasa (*CYP51*), una enzima esencial en la ruta biosintética del ergosterol. *CYP51* cataliza la desmetilación del eburicol (en hongos filamentosos) o lanosterol (en levaduras), ambos precursores del ergosterol que forma parte de la membrana celular en hongos y levaduras (Haitao *et al.*, 2003) (Fig. 4). El anillo heterocíclico de los azoles enlaza selectivamente con el grupo hemo de *CYP51*, interrumpiendo la eliminación del grupo C14-metil y la formación del ergosterol (Joseph-Horne y Hollomon, 1997). La acumulación de eburicol/lanosterol interfiere en las funciones del ergosterol como un componente de la membrana (Steffens *et al.*, 1996), alterando así la estructura de la membrana plasmática y la actividad de varias enzimas

asociadas con la síntesis de nutrientes y el transporte de quitina (Georgopapadakou y Walsh, 1996).

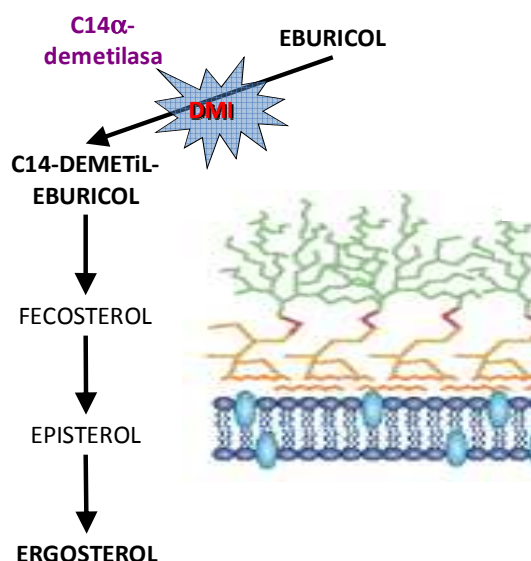


Figura 4. Ruta de biosíntesis del ergosterol. Cuando los fungicidas DMI actúan sobre su diana (C14 α -demetilasa), se bloquea la síntesis de ergosterol, y se acumula eburicol, produciéndose un desequilibrio estructural y funcional en la membrana plasmática del hongo.

5. MECANISMOS DE RESISTENCIA A FUNGICIDAS

La resistencia a fungicidas se define como la habilidad, existente en la naturaleza y heredable, de algunos individuos dentro de una población de una especie fúngica, que les permite sobrevivir a la aplicación de un fungicida que, en condiciones normales, resulta letal para el hongo. Un producto fungicida por sí solo no induce intrínsecamente resistencia, sino que actúa como un agente de selección. El desarrollo de la resistencia se produce cuando se siguen prácticas inadecuadas para la situación específica del cultivo y del patógeno (Brent, 1995). Existen factores genéticos y factores externos que rigen el riesgo de desarrollo de resistencia a un fungicida.

El riesgo de resistencia intrínseco es el resultado de la interacción entre la capacidad del patógeno a desarrollar resistencia y la predisposición del fungicida a provocarla. Se debe a la interacción entre el patógeno y el fungicida cuando la exposición del hongo al fungicida es máxima y sin restricciones de empleo. Se conocen ciertas características que son compartidas por los hongos que presentan un riesgo alto de desarrollar resistencia a fungicidas. Estas características son: ciclo de vida corto y muchas generaciones dentro del mismo cultivo,

fecundidad alta, alta variabilidad genética, la existencia de resistencias cruzadas y alta adaptabilidad de las cepas resistentes.

Por otro lado, el riesgo de factores externos influye sobre la presión de selección que conduce al desarrollo de la resistencia, influenciado por las características específicas del cultivo, la zona geográfica y el modo de uso (Brent y Hollomon, 1998).

P. fusca es un patógeno clásico en lo que al desarrollo de resistencia a fungicidas se refiere (McGrath, 2001) por lo que es necesario implantar estrategias adecuadas para controlar la aparición de éstas. Con respecto a las distintas clases de fungicidas, hay grupos que poseen distintos riesgos en la pérdida de la eficacia.

En el caso de los fungicidas de contacto (p.e. azufre) al presentar modos de acción muy diversos y actuar sobre diversos procesos metabólicos, presentan un bajo riesgo de desarrollo de resistencias.

En el caso de fungicidas sistémicos, los fungicidas MBC (p.e. metil-tiofanato) y los fungicidas QoI poseen un alto riesgo de pérdida de eficacia ya que mediante la mutación de un gen, los patógenos pueden desarrollar fácilmente resistencia al alterar la diana del fungicida (Anónimo, 2013b). Otros fungicidas sistémicos de base oligogénica como los fungicidas DMI, los fungicidas AZN (p.e. quinoxifén) y las pirimidinas (p.e. bupirimato) poseen un menor riesgo de desarrollar resistencias en el patógeno (Anónimo, 2013b).

5.1. Bases moleculares de la resistencia fungicidas QoI

La rápida aparición de resistencia a fungicidas QoI en diferentes hongos patógenos ya apunta a que el principal mecanismo por el que los hongos desarrollan resistencia, es la existencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para la proteína diana del fungicida, que en este caso es el *CYTB* (Fisher *et al.*, 2004). En literatura se han descrito principalmente tres sustituciones como las responsables de conferir resistencia a estos compuestos, conferidas por un polimorfismo de nucleótido simple (SNP: single nucleotide polymorphism). En la mayoría de los casos, la resistencia se ha descrito debido a la mutación G143A, en la cual la glicina es reemplazada por una alanina, en la posición del aminoácido 143 y confiere una resistencia total (Sierotzki *et al.*, 2000).

La resistencia a fungicidas QoI también puede estar mediada por la inducción de una respiración alternativa, en la que está implicada la enzima oxidasa alternativa (AOX), que provoca una desviación en la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo succinato-deshidrogenasa (complejo II) (Fig. 3.1). En las cepas españolas de *P. fusca* el papel

de la respiración alternativa fue descartado y los mecanismos responsables de la resistencia a fungicidas QoI permanecen sin ser caracterizados (Fernández-Ortuño *et al.*, 2008a).

5.2. Bases moleculares de la resistencia a fungicidas DMI

En el caso de los fungicidas DMI la resistencia a menudo surge como resultado de varios mecanismos de resistencia (Sanglard, 2002). En hongos filamentosos principalmente hay dos mecanismos que han sido descritos por conferir resistencia a fungicidas DMI: i) Alteración en la diana del fungicida (*CYP51*), disminuyendo así la afinidad del inhibidor (Zhan *et al.*, 2006), ii) Sobreexpresión del gen diana (*CYP51*), por lo que se seguiría realizando la producción de ergosterol aunque parte pueda ser inhibido (Ma *et al.*, 2006).

Datos recientes sobre el análisis molecular del gen *CYP51* en aislados sensibles y resistentes a fungicidas DMI, mostraron una correlación entre ciertas sustituciones de aminoácidos en *CYP51* y la resistencia a fungicidas DMI observada en los diferentes fenotipos de *P. fusca*, pero no mostraron diferencias en la expresión de *CYP51* (López-Ruiz, 2009). Aunque ya partimos de estos datos, las variaciones cuantitativas en los fenotipos resistentes no pueden ser completamente explicadas por mutaciones en un único gen, lo que sugiere la presencia de mecanismos adicionales en la resistencia a estos compuestos.

5.3. El papel de los transportadores de membrana en la resistencia a fungicidas

En la naturaleza, los hongos filamentosos están expuestos a una amplia variedad de compuestos tóxicos como pueden ser antibióticos producidos por otros organismos, productos de defensa de la planta como las fitoalexinas, además de multitud de antibióticos o micotoxinas producidos por ellos mismos, para poder competir con otros organismos que colonizan su nicho. Así, gracias a la participación de los transportadores de membrana, los hongos pueden autoprotgerse contra la acción de toxinas exógenas y endógenas (Fig.5). La sobreexpresión de estos transportadores juega un papel fundamental en la resistencia a una amplia gama de compuestos no relacionados químicamente, lo que se conoce como resistencia multidroga (MDR: MultiDrug Resistance). Los transportadores de membrana del tipo ABC (ATP-Binding Cassette) y MFS (Major Facilitator Superfamily) son los transportadores más importantes involucradas en la protección frente a fungicidas en hongos

(Stergiopoulos *et al.*, 2002). La importancia de estos transportadores en la resistencia a fungicidas QoI y DMI han sido descritos en numerosos hongos filamentosos, ya que tienen la capacidad de secretar estos compuestos tóxicos al entorno externo, impidiendo su acumulación dentro de las células (Andrade *et al.*, 2000; Reimann y Deising 2005; de Waard *et al.*, 2006).

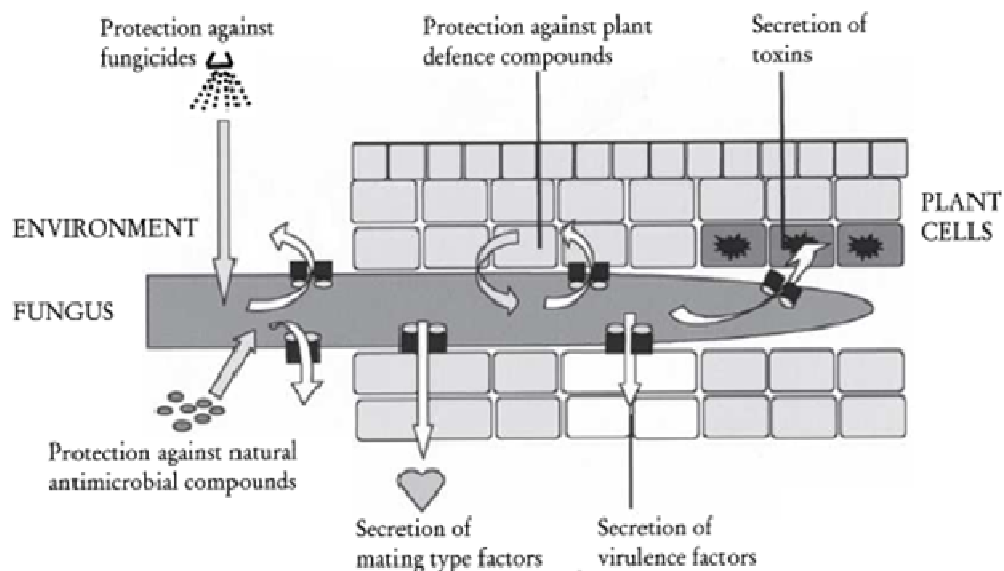


Figura 5. Funciones de los transportadores de membrana en hongos filamentosos. Tomado de Stergiopoulos *et al.* (2002).

6. COSTE BIOLÓGICO

En la selección impuesta por los compuestos antifúngicos, las poblaciones de hongos con frecuencia seleccionan individuos resistentes. Uno de los aspectos más interesantes del fenómeno de la resistencia a fungicidas, es que esta resistencia supone normalmente un coste biológico para el patógeno (fitness cost) (Cowen *et al.*, 2001). El efecto de la resistencia al fungicida es un factor importante en el mantenimiento a largo plazo de este fenotipo en las poblaciones de hongos. Así, aunque se conozcan los mecanismos moleculares para la resistencia, se realizan medidas del impacto de estos mecanismos en la biología del patógeno a diferentes condiciones ambientales (Anderson, 2005). Si existe un coste biológico asociado a la resistencia al fungicida, la frecuencia de aislados resistentes disminuirá en ausencia de este fungicida. Esto se ha demostrado en otros oídios como *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, donde se detectó una disminución en la frecuencia de aislados resistentes a fungicidas DMI en ausencia del fungicida (Al-Mughrabi y Gray, 1995).

En la literatura también encontramos el caso contrario, donde no existe un coste biológico asociado a la resistencia al fungicida. De esta manera, la frecuencia de aislados resistentes no disminuirá en ausencia del fungicida. Esto se detectó en el oídio de cucurbitáceas en Japón, donde se detectaron que los aislados resistentes a fungicidas QoI persistían tras varios años en ausencia del fungicida (Ishii *et al.*, 2002).

De cualquier manera, la observación de un posible coste biológico asociado a la resistencia a un determinado fungicida es una información relevante desde el punto de vista del manejo de la resistencia, ya que una moratoria en el uso del fungicida permitiría reducir las poblaciones resistentes del patógeno y de esta manera alargar la vida útil del fungicida. Por tanto, los estudios encaminados a determinar el coste biológico asociado o no a la resistencia a un fungicida son relevantes y pertinentes para ayudar a establecer estrategias de manejo de resistencia más adecuadas.

7. REFERENCIAS

- Al-Mughrabi KI and Gray AB, 1995. Competition between triadimefon-sensitive and triadimefon-resistant isolates of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis* **79**: 709–712.
- Álvarez B, 1993. Epidemiología de *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.) Poll. en melón. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga, Málaga, España.
- Anderson JB, 2005. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* **3**: 547-556.
- Andrade AC, del Sorbo G, Van Nistelrooy JGM and de Waard M, 2000. The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology* **146**: 1987-1997.
- Anke T, 1995. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Can J Bot* **73**: 940–945.
- Anónimo, 2011; Syngenta, 2010. (http://www.redorbit.com/news/health/1993253/syngenta_announces_2010_full_year_results/).
- Anónimo, 2013a. Asociación empresarial para la protección de las plantas (AEPLA). (<http://www.aepla.es/el-mercado-fitosanitario/evolucion-del-mercado>).
- Anónimo, 2013b. Fungicide Resistance Action Committee. QoI and SBI working group. CropLife international (<http://www.frac.info/frac/index.htm>).
- Anónimo, 2013c. Fungicide Resistant Action Committee (FRAC) code list 2013. (<http://www.frac.info/publication/ahang/FRAC%20Code%20List%202013-final.pdf>).
- Anónimo, 2014. Registro de productos fitosanitarios. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>).

- Askary H, Carrier Y, Bélanger RR and Brodeur J, 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Sci Techn* **8**: 23-32.
- Bardin M, Carlier J and Nicot PC, 1999. Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichoracearum*, a casual agent of powdery mildew of cucurbits. *Eur J Plant Pathol* **48**: 531-540.
- Barlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M and Parr-Dobrzanski B, 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci* **58**: 649-662.
- Bélanger RR and Labbé C, 2002. Control of powdery mildew without chemicals: prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. In: *The powdery mildews: A comprehensive treatise*. APS Press. St. Paul, MN, USA, pp 256-267.
- Benveniste P, 2004. Biosynthesis and accumulation of sterols. *Ann Rev Plant Biol* **55**: 429-457.
- Braun U and Cook RTA, 2012. Taxonomy manual of *Erysiphales* (powdery mildews). CBS Biodiversity. Utrecht, Netherlands, Series No 11.
- Braun U, Cook RTA, Inman AJ and Shin HD, 2002. The taxonomy of the powdery mildew fungi. In: *The powdery mildews: A comprehensive treatise*. APS Press. St. Paul, MN, USA, pp 13-55.
- Brent KJ and Hollomon DW, 1998. Fungicide resistance: The assessment of risk. FRAC Monograph nº2 (www.frac.info).
- Brent KJ, 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC Monograph nº1 (www.frac.info).
- Bushnell WR and Gay JL, 1978. Accumulation of solutes in relation to the structure and function of haustoria in powdery mildews. In: *The powdery mildews*. Academic Press. London, UK, pp 183-235.
- Cowen LE, Kohn LM and Anderson JB, 2001. Divergence in fitness and evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**: 2971-2978.
- de Waard MA, Andrade AC, Hayashi K, Schoonbeek H, Stergiopoulos I and Zwieters L, 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Manag Sci* **62**: 195-207.
- del Pino D, Olalla L, Pérez-García A, Rivera ME, García S, Moreno R, de Vicente A and Torés JA, 2002. Occurrence of races and pathotypes of cucurbit powdery mildew in southeastern Spain. *Phytoparasitica* **30**: 459-466.
- Ehlers RU, 2011. Regulation of biological control agents and the EU policy support action REBECA. In: *Regulation of biological control agents*. Springer Verlag. Berlin, Germany, pp 3-23.
- Elad Y, Kirshner B, Yehude N and Sztejnberg A, 2004. Management of powdery mildew and gray mold of Cucumber by *Trichoderma harzianum* T39 and *Ampelomyces quisqualis* AQ10. *Biocontrol* **43**: 241-251.
- Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, López-Ruiz FJ, Romero D, De Vicente A and Torés JA, 2006. Occurrence and distribution of resistance to QoI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. *Eur J Plant Pathol* **115**: 215-222.

- Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A and Pérez-García A, 2010. The QoI fungicides, the rise and fall of a successful class of agricultural fungicides. In: *Fungicides*. Tech publisher. Croatia, pp 203-220.
- Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A and 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 Manag Sci* **64**: 694-702.
- Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A and Pérez-García A, 2008b. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Int Microbiol* **11**: 1-9.
- Fisher N, Brown AC, Sexton G, Cook A, Windass J and Meunier B, 2004. Modeling the Qo site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b*. *Eur J Biochem* **271**: 2264-2271.
- Georgopapadakou NH and Walsh TJ, 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Ch* **40**: 279-291.
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A and McCaffery A, 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag Sci* **58**: 859-867.
- Glawe DA, 2008. The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly know) plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 27-51.
- Green EA and Gustafson GD, 2006. Sensitivity of *Uncinula necator* to quinoxyfen: evaluation of isolates selected using a discriminatory dose screen. *Pest Manag Sci* **62**: 492-497.
- Haitao J, Wannian Z, Min Z, Makiko K, Yuri A, Yuzo Y, Chunquan S, Yunlong S, Song Y, Youjun Z, Jiaguo L and Jü Z, 2003. Structure-based de novo design, synthesis and biological evaluation of non-azole inhibitors specific for lanosterol 14 α -demethylase of fungi. *J Med Chem* **46**: 474-485.
- Highland HB, 2000. AgraQuest search for Serenade: The isolation and development of a new biopesticide for plant protection. *Phytopathology* **90**: S101.
- Hirata K, 1976. Notes on host range and geographical distribution of powdery mildew fungi. VI Distribution on the host of powdery mildew fungi in the families of angiosperms. *Trans Mycol Soc Japan* **17**: 35-62.
- Hof H, 2001. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrob Agents Ch* **45**: 2987-2990.
- Hollomon DW and Wheeler IE, 2002. Controlling powdery mildews with chemistry. In: *The powdery mildew. A comprehensive treatise*. APS Press. St. Paul, MN, USA, pp 249-255.
- Hückelhoven R, 2005. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiol Lett* **245**: 9-17.
- Ishii H, Sugiyama T, Nishimura K and Ishikama Y, 2002. Strobirulin resistance in cucumber pathogens: persistence and molecular diagnosis of resistance. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*. AgroConcept. Bonn, Germany, pp 149-159.
- Jahn M, Munger HM and McCreight JD, 2002. Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. In: *The powdery mildews: A comprehensive treatise*. APS Press. St. Paul, MN, USA, pp 239-248.
- Jarvis WR, Shaw LA and Traquair JA, 1989. Factors affecting antagonism of cucumber powdery mildew by *Stephanoascus floculosus* and *S. rugulosus*. *Mycol Res* **92**: 162-165.

- Joseph-Horne T and Hollomon DW, 1997. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiol Lett* **149**: 141-149.
- Leonard P and Gianessi NR, 2005. The value of fungicides in U.S. In: *Crop production*. CropLife Foundation. Washington, USA.
- López-Ruiz FJ, 2009. Resistance to sterol demethylation inhibitor fungicides in *Podosphaera fusca*. Agronomic and molecular aspects. Doctoral Thesis. Málaga University, Málaga, Spain.
- López-Ruiz FJ, Pérez- García A, Fernández-Ortuño D, Romero D, García E, Cánovas I, de Vicente A, Brown JKM and Torés JA, 2010. Sensitivity to DMI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. *Pest Manag Sci* **66**: 801-808.
- Lucas JA, 1998. Plant pathology and plant pathogens. Blackwell science. Oxford, UK.
- Ma Z, Proffer TJ, Jacobs JL and Sundin GW, 2006. Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (*CYP51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Appl Environ Microb* **72**: 2581-2585.
- Marín Rodríguez J, 2013. Portagranos. Vademécum de semillas, XIV edición, 2013-14. El Ejido, Almería, España.
- McCreight JD, 2006. Melon-powdery mildew interactions reveal variation in melon cultigens and *Podosphaera xanthii* races 1 y 2. *ASHS Journal* **131**: 59-65.
- McGrath MT and Shishkoff N, 2000. Control of cucurbits powdery mildew with JMS Stylet Oil. *Plant Dis* **84**: 989-993.
- McGrath MT, 1994. Heterothallism in *Sphaerotheca fuliginea*. *Mycologia* **86**: 517-523.
- McGrath MT, 2001. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: Experiences and challenges. *Plant Disease* **85**: 236-245.
- Pauliz TC and Bélanger RR, 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 103-133.
- Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF and Bai Y, 2010. Loss of susceptibility as a novel strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Mol Breeding* **25**: 1-12.
- Pérez-García A, Olalla L, Rivera ME, del Pino D, Cánovas I, de Vicente A and Torés JA, 2001. Development of *Sphaerotheca fusca* on susceptible, resistant, and temperature-sensitive melon cultivars. *Mycol Res* **105**: 1216-1222.
- Pérez-García A, Romero D, Fernández-Ortuño D, López-Ruiz FJ, de Vicente A and Torés JA, 2009. The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbit. *Mol Plant Pathol* **10**: 153-160.
- Reimann S and Deising HB, 2005. Inhibition of efflux transporter mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Appl Environ Microb* **71**: 3269-3275.
- Ridout CJ, 2009. Profiles in pathogenesis and mutualism: powdery mildews. In: *The mycota V*. Springer-Verlag. Berlin, Germany, pp 51-68.
- Russell PE, 2005. A century of fungicide evolution. *J Agr Sci* **143**:11-25.
- Sanglard D, 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungals drugs. *Curr Opin Microbiol* **5**: 379-385.
- Sauter H, Steglich W and Anke T, 1999. Strobilurins: Evolution of a new class of active substances. *Angew Chem Int Edit* **38**: 1329-1349.

- Schmitt JA, 1955. The host specialization of *Erysiphe cichoracearum* from *Zinnia*, *Phlox* and *Cucurbits*. *Mycologia* **47**: 688-701.
- Shanmugasundaram S, Williams PH and Peterson CE, 1971. Inheritance of resistance to powdery mildew in cucumbers. *Phytopathology* **61**: 1218-1221.
- Sierotzki H, Frey R, Wullschlegel J, Palermo S, Karlin S, Goodwin J and Gissi U, 2007. Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Manag Sci* **63**: 225–233.
- Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S and Gisi U, 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome *bc*₁ enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Manag Sci* **56**: 833–841.
- Sitterly WR, 1978. Powdery mildews of cucurbits. In: *The Powdery Mildews*. Academic Press. London, UK, pp 359-379.
- Smith JM, Dunex J, Phillips DH, Lelliot RA, 1988. Ascomycetes I. Generalidades. Endomycetales, Taphrinales, Eutiales, Erysiphales. In: *Manual de Enfermedades de Plantas*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Spanu PD, 2006. Why do some fungi give up their freedom and become obligate dependants on their host? *New Phytol* **171**: 447-450.
- Steffens JJ, Pell EJ and Tien M, 1996. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Curr Opin Biotech* **7**: 348-355.
- Stergiopoulos I, Zwiers LH and de Waard MA, 2002. Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. *Eur J Plant Pathol* **108**: 719–734.
- Sztejnberg A, Galper S, Mazar S and Lisker N, 1989. *Ampelomyces quisqualis* for biological and integrated control of powdery mildew in Israel. *J Phytopathol* **124**: 285-289.
- Terrell CL, 1999. Antifungal agents. Part II. The azoles. *Mayo Clin Proc* **74**: 78-100.
- Torés JA y Álvarez JM, 1994. Oídio (*Sphaerotheca fuliginea*, *Erysiphe cichoracearum*, *Leveillula taurica*). In: *Enfermedades de las cucurbitáceas en España*. Phytoma. Valencia, España, pp 65-68.
- Wolfe MS, 1991. Recent developments in using variety mixtures to control powdery mildew of barley. In: *Integrated control of cereals mildews: virulence patterns and their change*. Proceeding of second European workshop on integrated control of cereal mildew. Roskilde, Demark, pp 235-243.
- Zhan J, Stefanato F and McDonald BA, 2006. Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and response to host resistance. *Mol Plant Pathol* **7**: 259-268.
- Zitter TA, Hopkins DL and Thomas CE, 1996. In: *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press. St. Paul, MN, USA.

El cultivo de las cucurbitáceas es de especial importancia en España. Una limitación importante de estos cultivos es el desarrollo de enfermedades. El oídio de las cucurbitáceas (*Podosphaera fusca*) ha sido descrito como una de las principales enfermedades que afecta a estos cultivos. Los síntomas se caracterizan por la aparición de manchas redondeadas de color blanquecino y aspecto pulverulento, que se extienden gradualmente sobre las hojas y tallos, provocando la senescencia temprana de la planta, así como importantes reducciones en la cantidad, calidad y tamaño de los frutos.

El uso de cultivares resistentes, organismos antagonistas y fungicidas, son las principales herramientas para el control de la enfermedad. Actualmente aunque se desarrollan estrategias de control integrado que combinan todas estas herramientas, el uso extensivo de fungicidas es la principal estrategia de control, ya que al ser *P. fusca* un hongo de desarrollo externo en la planta, el fungicida entra fácilmente en contacto con él. Destaca el uso de fungicidas sistémicos, que son absorbidos por la planta y transportados por el xilema, siendo inocuos para la planta y suelen actuar de forma específica en los hongos. El uso de estas materias se convierte en un arma de doble filo, ya que al ser compuestos muy específicos afectan a puntos concretos del patógeno, pero este puede desarrollar fácilmente mecanismos de resistencia.

En España, el control del oídio de las cucurbitáceas provocado por *Podosphaera fusca* se basa principalmente en el uso de compuestos químicos como los fungicidas QoI (inhibidores de la cadena respiratoria) y los fungicidas DMI (inhibidores de la síntesis de ergosterol). Estos productos han perdido parte de su eficacia debido a la aparición de cepas resistentes, lo que ha conducido en muchos casos al fracaso de las estrategias de control de la enfermedad. Trabajos anteriores, se detectaron elevadas frecuencias de aislados resistentes de *P. fusca* en las principales zonas de producción de cucurbitáceas. Por ello, entre los objetivos del presente estudio se ha profundizado en el conocimiento de los diferentes mecanismos moleculares implicados en la resistencia a los fungicidas

QoI y DMI en *P. fusca* en España.

Los fungicidas QoI son un importante grupo de fungicidas que actúan inhibiendo la cadena respiratoria, actuando en el sitio de oxidación del ubiquinol (Qo) Éste Qo se encuentra en el citocromo bc_1 (*CYTBC₁*); formado por el citocromo *b* (*CYTB*), citocromo c_1 (*CYTC₁*) y dominios de la sulfo-proteína de Rieske (*ISP*). La inhibición de la respiración mitocondrial se logra mediante el bloqueo del transporte de electrones entre el citocromo *b* (*CYTB*) y citocromo c_1 (*CYTC₁*), que en consecuencia conduce a una interrupción del ciclo de energía suspendiendo la producción de ATP. Hasta ahora, el mecanismo por el cual las poblaciones

de *P. fusca* en España adquirirían la resistencia a estos fungicidas no estaba claro. En estudios previos, la inducción de una respiración alternativa sostenida por la oxidasa fue descartada. En este trabajo, el papel del *CYTB* en la resistencia a fungicidas QoI ha sido re-analizado mediante el examen molecular de una colección de cepas de *P. fusca*. Nuestros datos sugieren que el mecanismo responsable de la resistencia QoI en *P. fusca* es la típica mutación G143A en el *CYTB* y que la proporción de mitocondrias mutadas es un factor importante para el desarrollo de la resistencia.

Además, existen otros mecanismos alternativos que pueden estar implicados en la resistencia a fungicidas. En la naturaleza, los hongos filamentosos están expuestos a una amplia variedad de compuestos tóxicos como pueden ser los fungicidas. Así, gracias a la participación de los transportadores de membrana, los hongos pueden autoprotgerse contra la acción de toxinas exógenas y endógenas. Estudiamos el papel de estos transportadores en aislados resistentes a fungicidas QoI y DMI, utilizando moléculas fluorescentes e incubando con diferentes protonóforos para conocer su carácter bioenergético. Se observó una sobreexpresión de transportadores tipo ABC en cepas resistentes a fungicidas QoI y DMI en *P. fusca*. Además, aislamos un fragmento de un supuesto gen tipo ABC en *P. fusca* (*PfABC1*), del cual se analizó su expresión en presencia de fungicidas. Los resultados indicaron que *PfABC1* parece estar implicado en la protección de *P. fusca* frente a la toxicidad de fungicidas DMI.

Además, debido a las elevadas frecuencias de aislados resistentes de *P. fusca* a fungicidas QoI y DMI, realizamos estudios de fitness cost asociados a estas resistencias. El fitness cost asociado a la resistencia a fungicidas es un parámetro fundamental para la utilización de fungicidas en programas de gestión de resistencias. Sirve para determinar el resultado de la competencia entre las cepas resistentes y sensibles de patógenos, así como para evaluar la utilidad de los fungicidas a medio y largo plazo. Estudiamos la germinación de conidios, y el tamaño de la colonia en cepas sensibles y resistentes a fungicidas QoI y DMI. Comparamos los datos obtenidos a diferentes condiciones de temperatura, entre las diferentes cepas sensibles y resistentes de *P. fusca* a los fungicidas QoI y DMI. Los valores de germinación en el grupo de los aislados resistentes a fungicidas QoI presentaron valores significativamente más altos que los del grupo de los aislados sensibles, mientras que el grupo de los aislados resistentes a fungicidas DMI presentaron valores significativamente más bajos que los del grupo de los aislados sensibles. Con respecto a los valores de crecimiento no detectamos diferencias en ninguno de los grupos de resistencia (a fungicidas QoI o DMI) frente al de los sensibles. Los resultados indicarían que no se detectó coste de fitness asociado a la resistencia a fungicidas QoI en ninguno de los parámetros estudiados. Sin embargo, sólo algunos valores

de germinación presentaron un coste de fitness asociado a la resistencia a fungicidas DMI. Estos resultados sugieren que el uso de fungicidas QoI debería limitarse puesto que implicaría la selección de cepas resistentes sin ningún tipo de coste. Esto se traduciría en la aparición de una población mayoritaria estable y resistente a fungicidas QoI con el paso del tiempo. Con respecto al uso de fungicidas DMI, podríamos seguir utilizándolos moderadamente, o en combinación con otros fungicidas de diferente modo de acción.

Tras profundizar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a los principales grupos de fungicidas utilizados para *P. fusca* frente, creímos de gran interés aportar información detallada sobre la distribución y niveles de resistencia a otros fungicidas utilizados en España para el control del oídio de las cucurbitáceas. Se realizaron ensayos de discos estudiando la sensibilidad frente a bupirumato, quinoxifen y metiltiofanato en una colección de 237 aislados recolectados entre los años 2002-2011 en las principales zonas productoras de cucurbitáceas. Los resultados obtenidos fueron unos elevados niveles de resistencia frente a metiltiofanato, sugiriendo su falta de utilidad para el control del oídio de las cucurbitáceas. Sin embargo, no se detectó resistencia a bupirumato y quinoxifén, lo que indica que siguen siendo materias efectivas contra el control de la enfermedad.

Las principales conclusiones que se derivan del presente trabajo han sido las siguientes:

1ª La reexaminación del papel de citocromo *b* en la resistencia a fungicidas en *P. fusca* sugiere que la sustitución G143A es la principal responsable de la resistencia a fungicidas QoI y que la heteroplasmia mitocondrial juega un papel fundamental en la manifestación de dicha resistencia.

2ª En este estudio se ha puesto de manifiesto por primera vez la actividad y la expresión de transportadores de membrana tipo ABC en respuesta a fungicidas DMI y QoI en *P. fusca*, lo que sugiere un papel, todavía por determinar, para los transportadores de membrana en la resistencia a fungicidas en este patógeno.

3ª En las condiciones experimentales ensayadas, las resistencias a fungicidas QoI y a fungicidas DMI en *P. fusca* no parecen tener asociada un coste de fitness.

4ª Las elevadas frecuencias de resistencia a metil tiofanato observadas en las poblaciones de *P. fusca* de la mitad sur de España sugiere su eliminación del registro de productos fitosanitarios. Por el contrario, la escasa o nula resistencia observada frente a bupirimato, miclobutanil y quinoxifén hace que se deban mantener como herramientas eficaces para el control del oídio de las cucurbitáceas.

5ª En este estudio se ha detectado por primera vez la existencia de aislados de *P. fusca* resistentes a varios fungicidas, lo que hace más patente si cabe el problema de la resistencia a fungicidas en oídio de las cucurbitáceas en España.

6ª La aparición de resistencia a las principales clases de fungicidas en las poblaciones españolas de *P. fusca* sugiere la implantación urgente de estrategias de control integrado para el manejo del oídio de las cucurbitáceas