

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE
***VENTURIA INAEQUALIS* A FUNGICIDAS DE USO COMÚN**
EN MANZANOS.

OLIVER ALBERTO SARMIENTO VILLAVICENCIO

SANTIAGO - CHILE
2011

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Venturia inaequalis* A FUNGICIDAS
DE USO COMÚN EN MANZANOS.**

**SENSITIVITY OF CHILEAN ISOLATES OF *Venturia inaequalis* TO FUNGICIDES
COMMONLY USED IN APPLES.**

OLIVER ALBERTO SARMIENTO VILLAVICENCIO

**SANTIAGO, CHILE
2011**

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Venturia inaequalis* A FUNGICIDAS
DE USO COMÚN EN MANZANOS.**

**Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo**

OLIVER ALBERTO SARMIENTO VILLAVICENCIO

	Calificaciones
Profesor Guía Sr. José Luis Henríquez S. Ingeniero Agrónomo, M.S, Ph.D.	7,0
Profesores Evaluadores Sra. Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, M.S.	6,5
Sr. Italo Chiffelle G. Bioquímico, Dr.	6,7

SANTIAGO, CHILE
2011

Para mis padres Sergio y Vicky.

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos padres por la confianza y el apoyo incondicional de siempre.

A Carla mi palomita por su amor de calidad y lealtad.

Al Profesor José Luis Henríquez por su compromiso y disposición.

A Paula por su paciencia y orden en el laboratorio.

A la Sra. Pilar por sus buenas vibras y oraciones.

A la Biblioteca Municipal de Quilicura por brindarme el lugar propicio para lograr el objetivo.

Al Profesor Antonio Rustom por su tiempo y certeza.

A mis grandes amigos Carloco, Betza, Pierre, Chicha, Ricky, Otárola y Alonso por la música, el sentimiento e inolvidables momentos vividos.

Al Señor por caminar a mi lado todos los días de la vida.

Y finalmente a todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron en esta trascendental etapa personal.

INDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Hipótesis y Objetivos.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Establecimiento de una línea base de sensibilidad de <i>Venturia inaequalis</i> a diferentes fungicidas utilizados para el control de la sarna del manzano y determinación de la sensibilidad a fungicidas de aislados del patógeno provenientes de huertos comerciales bajo constante uso de fungicidas.....	9
Origen de los aislados.....	9
Obtención de cultivos monospóricos y colección de aislados.....	9
Evaluación de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Venturia inaequalis</i> a fungicidas.....	10
Mancozeb.....	11
Difenoconazole, Fenarimol y Pyrimethanil.....	11
Análisis estadístico.....	12
RESULTADOS.....	14
Establecimiento de una línea base de sensibilidad de <i>Venturia inaequalis</i> a diferentes fungicidas utilizados para el control de la sarna del manzano.....	16
Mancozeb.....	16
Difenoconazole.....	18
Fenarimol.....	18
Pyrimethanil.....	20

Determinación de la sensibilidad a fungicidas de poblaciones de <i>Venturia inaequalis</i> provenientes de huertos comerciales bajo constante uso de fungicidas.....	21
Mancozeb.....	21
Difenoconazole.....	24
Fenarimol.....	27
Pyrimethanil.....	30
DISCUSIÓN	33
Mancozeb.....	33
Difenoconazole.....	34
Fenarimol.....	36
Pyrimethanil.....	38
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42

RESUMEN

La sarna del manzano causada por *Venturia inaequalis* es la enfermedad más importante del manzano en Chile y a nivel mundial, y su control está basado principalmente en el uso de fungicidas. En los últimos años se ha observado en Chile una aparente disminución del nivel de control de la enfermedad con los fungicidas comúnmente utilizados con este propósito y se especula sobre una posible pérdida de sensibilidad de poblaciones del patógeno. Durante las temporadas 2006-2009, se obtuvo una colección de 128 cepas del patógeno que provino de hojas de manzanos infectados con sarna recolectadas entre las regiones VII y IX. Se realizaron pruebas de sensibilidad a los fungicidas mancozeb, difenoconazole, fenarimol y pyrimethanil en aislados monoconidiales de cepas silvestres del patógeno con el objetivo de elaborar curvas basales de sensibilidad y compararlas con la sensibilidad de aislados monoconidiales provenientes de seis huertos comerciales sin evidencias de resistencia práctica. La sensibilidad en las pruebas *in vitro* se midió como la inhibición de crecimiento miceliar (difenoconazole, fenarimol, y pyrimethanil) ó la inhibición de la germinación de conidias (mancozeb). A partir de los resultados obtenidos se propusieron dosis discriminatorias de 0,04; 1,0; 0,6; y 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para difenoconazole, fenarimol, mancozeb y pyrimethanil, respectivamente. La población de huertos comerciales estudiada presentó una menor sensibilidad a los fungicidas difenoconazole, fenarimol y mancozeb con valores de factor de resistencia 4,7; 5,8 y 2,1, respectivamente. La mayor diferencia de sensibilidad entre la población silvestre y la de huerto se observó en fenarimol, fungicida para el cual la población de aislados de huerto presentó el mayor cambio hacia una menor sensibilidad. Por el contrario, para pyrimethanil, la población de huerto no evidenció pérdida significativa de sensibilidad en relación a la población basal.

Palabras Clave: Sarna del manzano, manzano, fungicidas IBE, anilinoimidinas, ditiocarbamatos.

ABSTRACT

Apple scab caused by *Venturia Inaequalis* is the most important disease of apples worldwide, and its control is primarily based on fungicides. In recent years an apparent disease control failure has been observed in Chile. A potential loss of fungicide sensitivity from pathogen populations is speculated. A collection of 128 strains were isolated from diseased leaves collected between VII and IX regions, during 2006 to 2009. Sensitivity tests to the fungicides mancozeb, difenoconazole, fenarimol, and pyrimethanil were conducted on wild isolates to build local baseline sensitivity distributions and to compare with the sensitivity of strains from six different commercial orchards without evidence of practical resistance. *In vitro* tests were measured as inhibition of mycelial growth or conidial germination (mancozeb). Discriminatory doses of 0.04; 1.0; 0.6; and 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were proposed according to the *in vitro* monitoring of sensitivity to difenoconazole, fenarimol, mancozeb and pyrimethanil, respectively. Departure from the baseline distribution towards less sensitivity was found for difenoconazole, fenarimol and mancozeb with resistance factors of 4.7; 5.8 and 2.1 respectively. The highest difference between baseline and orchard population was observed for fenarimol which showed the higher shift towards less sensitivity. In contrast, pyrimethanil did not show a not significant shift.

Key Words: Apple scab, apple, DMI fungicides, dithiocarbamates, anilinopyrimidines.

INTRODUCCIÓN

La sarna del manzano causada por *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. (anamorfo *Spilocaea pomi* Fr.) es la enfermedad más importante de este frutal en Chile y a nivel mundial (Latorre, 2003). El patógeno corresponde al phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, clase Dothideomycetes, subclase Pleosporomycetidae, orden Pleosporales, familia Venturiaceae (Kirk *et al*, 2008). Su fase sexual comprende la formación de ascosporas en pseudotecios que se originan en las hojas que caen al suelo del huerto durante la temporada otoñal. A principios de primavera, las ascosporas maduran y son expulsadas desde los pseudotecios (Alexopoulos y Mims, 1985) siendo transportadas por viento y lluvia hacia los árboles en un período de 5 a 9 semanas. La mayor descarga de ascosporas ocurre entre los estados de botón rosado y plena floración del huésped (Biggs, 1990). Esta fase corresponde a la infección primaria, que coincide con el inicio de la brotación del árbol hasta la cuaja del fruto. Una vez sobre los frutos y hojas el hongo penetra la cutícula y se ramifica en un estroma subcuticular el cual eventualmente produce conidióforos y conidias en una lesión visible (Biggs, 1990). Gran cantidad de esporas secundarias (conidias) son producidas en estas lesiones y son dispersadas durante períodos de lluvia. El agua barre las conidias que al caer sobre hojas y frutos causan infecciones secundarias (Swezey *et al*, 2000).

La enfermedad afecta la calidad de los frutos, reduce el tamaño de estos y el tiempo que pueden mantenerse almacenados. Un fruto joven en desarrollo, con una lesión de sarna puede reducir su tamaño y crecer de forma asimétrica (McHardy, 1996). La infección inicial de los frutos causa su deformación, debido a que el crecimiento bajo las pústulas se detiene, en tanto que los tejidos sanos siguen su desarrollo normal (Alvarez *et al.*, 2004). McHardy (1996) señala que la enfermedad afecta al árbol y las cosechas de varias formas. Cuando la infección ocurre en el pedúnculo de los frutos jóvenes ocasiona caída prematura de éstos. Las infecciones foliares severas disminuyen la superficie funcional de la hoja, producen defoliación del árbol y un desarrollo deficiente de las yemas frutales necesarias para la producción del año siguiente. Según Alvarez *et al* (2004) las infecciones tardías de frutos pueden manifestarse también en poscosecha, durante la guarda en frío (sarna de almacenaje). Torres y Andrade (1996) y Torres *et al.* (2002), señalan que el daño provocado por la sarna se traduce principalmente en la pérdida de valor comercial de los frutos afectados y en un debilitamiento paulatino de los árboles. Las pérdidas debidas a la sarna pueden llegar a un 70% o más del total de los frutos (Agrios, 1991).

Las infecciones ocurren a lo largo del período de crecimiento de los frutos en presencia de agua libre sobre los órganos de la planta (Biggs, 1990). La enfermedad se presenta con especial incidencia en aquellas regiones que se caracterizan por presentar clima húmedo y templado durante la primavera y verano, situación que ocurre frecuentemente entre las regiones VII y X de nuestro país (Alvarez y Pinilla, 2002), en esta zona a su vez se sitúa

alrededor de un 68 % (24.035 ha) de la superficie total plantada con manzanos (ODEPA, 2009). En general, el cultivo del manzano, entre la zona central y centro sur de Chile, principal zona productora de manzanas, ha estado dirigido preferentemente a la obtención de fruta de exportación, la cual requiere de una apariencia cosmética perfecta, libre de lesiones (Torres y Andrade, 1996)

En huertos comerciales, la enfermedad se controla mediante el uso de fungicidas organosintéticos, existiendo solo una fracción pequeña bajo manejo orgánico. Dado a que en algunas zonas las condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad se presentan en forma casi continua hasta cerca de la cosecha, se hace necesario realizar aplicaciones de fungicidas a calendario fijo. Torres *et al.* (2002), señalan que el control de la sarna se realiza principalmente con repetidas aplicaciones de productos químicos de alto costo, lo que sin duda provoca un impacto en el ambiente y en la biodiversidad del ecosistema: contaminación, mortalidad de la fauna benéfica, resistencia a fungicidas y aparición de potenciales nuevos patógenos. Implica además, un factor de riesgo en el cumplimiento de las tolerancias de residuos máximos aceptables en la fruta.

En las últimas temporadas se ha detectado una aparente disminución del nivel de control de los fungicidas tradicionalmente utilizados y se especula sobre la posible resistencia a fungicidas en algunas poblaciones del patógeno. Esta situación ha sido un problema serio en la zona sur donde recientemente se determinó la existencia de resistencia práctica a las estrobilurinas (Sallato y Latorre, 2006). McHardy (1996) señala que diversos productos de contacto y de acción sistémica han demostrado efectividad en el control de esta enfermedad, no obstante, Pinto de Torres *et al.* (1994), indican que la resistencia del patógeno a ciertos fungicidas ha resultado en muchos casos en la privación de su uso.

En el extranjero existen numerosos reportes sobre pérdida de eficacia de fungicidas destinados al control de la sarna del manzano, así es como en 1968 se reportó por primera vez falta de control con aplicaciones de dodine, uno de los primeros fungicidas específicos para el control de la enfermedad, después de haber sido utilizado extensivamente en huertos en el estado de Nueva York, Estados Unidos (Koller *et al.*, 1999). Resistencia a benzimidazoles en poblaciones de *V. inaequalis* fue detectada al poco tiempo del uso intensivo de benomilo en Michigan y en la mayoría de los países donde estos fungicidas han sido utilizados para el control de la enfermedad (Koenraad *et al.*, 1992). En el caso de los fungicidas inhibidores de la síntesis de ergosterol (IBE), aislamientos de *V. inaequalis* con sensibilidad reducida han sido reportados desde 1985 (Stanis y Jones, 1985), sin embargo, los casos de resistencia práctica, definida como bajos niveles de control a consecuencia de la selección de aislamientos resistentes, han sido poco documentados (Koller *et al.*, 1997).

A diferencia de otros fungicidas, como los benzimidazoles, con subpoblaciones discretas de fenotipos altamente resistentes, la distribución de frecuencias de fenotipos sensibles a fungicidas IBE es continua y varía desde fenotipos altamente sensibles hasta fenotipos considerablemente menos sensibles que la media poblacional. Esta distribución continua dificulta definir el grado de insensibilidad de un aislamiento capaz de esporular a dosis

recomendadas de un fungicida IBE (Koller *et al.*, 1997). De esta manera, fenotipos sustancialmente menos sensibles que el promedio y capaces de esporular en presencia del fungicida tendrán una ventaja competitiva sobre fenotipos completamente sensibles y por lo tanto serán seleccionados. El criterio de resistencia práctica se logra una vez que las frecuencias de estos fenotipos menos sensibles, alcanzan niveles a los cuales el control de toda población es insatisfactorio.

Actualmente a pesar del uso de los fungicidas en Chile se ha observado una mayor incidencia de la enfermedad en algunos huertos, situación que puede tener diversas causas, siendo una de ellas una posible pérdida de sensibilidad de poblaciones del patógeno. Esta pérdida de sensibilidad puede implicar que el patógeno sea capaz de esporular en lesiones tratadas con fungicidas en dosis comerciales.

Cualquier estudio tendiente a determinar niveles de pérdida de sensibilidad en poblaciones de un patógeno requiere conocer la sensibilidad natural de aquellas poblaciones con anterioridad al uso de los fungicidas. En estos estudios se muestrean poblaciones del patógeno desde donde se obtiene un gran número de aislamientos y se determina la distribución de frecuencias de aislamientos en una escala de sensibilidad conocida como una curva basal de sensibilidad (Koller *et al.*, 1991; Wong y Wilcox, 2002).

En Chile no existen antecedentes sobre sensibilidad basal de *V. inaequalis* a los fungicidas actualmente en uso (distribución de frecuencias de aislados no expuestos a un determinado fungicida en una escala de sensibilidad), y para cada estudio de sensibilidad de aislados chilenos se recurre a las curvas de sensibilidad basal determinadas en el extranjero. El conocimiento de la sensibilidad basal de aislados chilenos permitiría determinar la posible ocurrencia de pérdida de sensibilidad en algunas poblaciones y contribuiría a diseñar sistemas de manejo que permitan evitar o disminuir este problema.

Hipótesis. El conocimiento de la sensibilidad basal a fungicidas en poblaciones sin intervención química de *V. inaequalis* en Chile, permite evaluar el nivel de pérdida de sensibilidad en aquellas poblaciones de huertos comerciales, que se encuentran bajo constante aplicación de fungicidas.

Para comprobar esta hipótesis se definieron los siguientes objetivos:

Objetivo general. Determinar la sensibilidad de poblaciones de *V. inaequalis*, con y sin intervención de fungicidas, que permitan evaluar el grado de pérdida de sensibilidad a los fungicidas utilizados para su control.

Objetivos específicos:

- 1) Establecer una línea base de sensibilidad de *V. inaequalis*, a los fungicidas mancozeb, pyrimethanil, fenarimol y difenoconazole utilizados para el control de la sarna del manzano.
- 2) Determinar la sensibilidad de aislados de *V. inaequalis* provenientes de huertos comerciales bajo manejo químico a los fungicidas mancozeb, pyrimethanil, fenarimol y difenoconazole.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de una línea base de sensibilidad de *Venturia inaequalis* a diferentes fungicidas utilizados para el control de la sarna del manzano y determinación de la sensibilidad a fungicidas de aislados del patógeno provenientes de huertos comerciales bajo constante uso de fungicidas.

Origen de los aislados.

Para el establecimiento de la línea base de sensibilidad de *V. inaequalis* a fungicidas se utilizaron hojas infectadas con sarna, de manzanos individuales sin tratamiento anterior con fungicidas, ubicados en huertos caseros y casas particulares de zonas alejadas de huertos comerciales. Este material provino en su mayoría de localidades ubicadas en zonas precordilleranas entre las regiones VII y IX (Cuadro 1). Por otra parte para determinar la sensibilidad de aislados del patógeno provenientes de huertos comerciales se utilizaron hojas infectadas, con sarna, de manzanos de 6 huertos de la VII región y uno de la IX. La totalidad del material se recolectó durante los años 2006-2009. Posteriormente, se recuperaron los aislados y se sometieron a evaluaciones *in vitro* en el laboratorio de Fitopatología de Poscosecha de fruta, del Departamento de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Obtención de cultivos monospóricos y colección de aislados

Con el objetivo de obtener cultivos monospóricos se procedió a realizar suspensiones conidiales en agua destilada estéril con tween 80 (50 uL/1000 mL de agua destilada) a partir de lesiones individuales, de dichas suspensiones se depositaron 30 a 50 uL en placas de Petri con medio de cultivo agar agua o agar papa dextrosa (APD) y luego de 18 a 24 horas de incubación a 20°C, se transfirieron individualmente conidias germinadas a placas con medio agar papa dextrosa acidulado con ácido láctico (0,5 mL/1.000 mL) (APDa). Una vez establecidas las colonias monoconidiales se repicaron y se estableció una colección de 65 aislados silvestres y 63 aislados de huerto en un cepario.

Cuadro 1. Localidades de recolección de hojas de manzanos silvestres, sin tratamiento anterior con fungicidas, para la determinación de la curva basal de sensibilidad a los fungicidas estudiados.

Localidad	Región
Bullileo	VII
Huencuecho, Molina	VII
Los Rabones, Linares	VII
Los Notros	VII
Pelarco	VII
Piedra de Agua-Radal	VII
Upeo, Curico	VII
Vilches Alto	VII
Chivilingo	VIII
El Piulo	VIII
Las Trancas	VIII
Puente Marchant	VIII
Río Huequecura, Sta. Barbara	VIII
San Fabián de Alicó	VIII
Cairico	IX
El Alambrado	IX
Melipeuco	IX
Tracura	IX

Evaluación de la sensibilidad *in vitro* de *Venturia inaequalis* a fungicidas.

La sensibilidad *in vitro* de los aislados de *V. inaequalis* a fungicidas se evaluó para germinación conidial en el caso de mancozeb y crecimiento micelial para los restantes ingredientes activos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Fungicidas utilizados en la evaluación de sensibilidad *in vitro* de cepas de *V. inaequalis*.

Ingrediente	Activo	Producto Comercial	Formulación
Mancozeb		Dithane M-45	Polvo mojable
Fenarimol		Rubigan 12 EC	Emulsión concentrada
Difenoconazole		Score 250 EC	Emulsión concentrada
Pyrimethanil		Scala 40 SC	Suspensión concentrada

Mancozeb. Se trabajaron 50 cultivos monoconidiales de los aislados silvestres y 50 correspondientes a los aislados de huerto del total del cepario. Se prepararon suspensiones de conidias en agua destilada estéril a partir de cultivos puros de 4 a 5 semanas de edad, luego se tomó alícuotas de 50 uL que fueron depositadas en placas Petri con medio de cultivo APDa suplementado con el fungicida mancozeb a las concentraciones 0; 0,1; 1; 5; 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i.a, según metodología propuesta por Tremblay *et al.* (2003). Se hicieron 3 repeticiones por cada concentración del fungicida. Se incubaron a 20°C por 18 a 24 horas y posteriormente se procedió a determinar el porcentaje de inhibición de germinación de conidias. Se contaron 100 conidias por placa (repetición). Se consideró una conidia germinada cuando su tubo germinativo mostró un crecimiento de al menos una y media veces el largo de la conidia. El porcentaje de inhibición de germinación de las conidias (% I_G) se obtuvo en relación a la germinación que se observó en el control sin fungicida mediante la fórmula:

$$\% I_G = (1 - \text{germinación con fungicida} / \text{germinación sin fungicida}) \times 100$$

Difenoconazole, Fenarimol y Pyrimethanil: Se trabajaron 51 cultivos monoconidiales de aislados silvestres y 51 cultivos monoconidiales de aislados de huerto del total del cepario. Para el caso de los fungicidas IBE (difenoconazole y fenarimol), que no inhiben la germinación de conidias, se hicieron repiques de micelio de 1 mm de diámetro de cultivos monoconidiales de 5 a 7 semanas de edad en placas Petri con medio de cultivo APDa, suplementado con el fungicida difenoconazole a las concentraciones de 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i.a, y por otro lado, con el fungicida fenarimol a las concentraciones de 0; 0,01; 0,1; 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i.a, basado en la metodología propuesta por Koller *et al.* (1991).

En cuanto a la anilinopirimidina pyrimethanil la cuantificación de sensibilidad fue igualmente basada en la inhibición del crecimiento micelar de acuerdo a Neumann *et al.* (1992), que señalan que las anilinopirimidinas no son activas para inhibir germinación de esporas, no obstante si lo son para inhibición de elongación del tubo germinativo. Para la evaluación de este fungicida se efectuaron repiques de micelio desde cultivos monoconidiales de los aislados a placas Petri con un medio de cultivo sólido (10 g de glucosa; 1,5 g K_2HPO_4 ; 2 g KH_2PO_4 ; 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 12,5 g de agar por litro de agua destilada), suplementado con el fungicida ya mencionado a las concentraciones de 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i.a, según metodología propuesta por Leroux *et al.* (1999).

Por cada concentración de fungicida se consideraron tres repeticiones. Al cabo de cuatro semanas de incubación de los tratamientos a temperatura ambiente, se procedió a medir con un pie de metro dos diámetros perpendiculares en cada colonia y se calculó el promedio. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelar (% I_C) se determinó en relación al crecimiento observado en el control sin fungicida mediante la siguiente fórmula:

$$\% I_C = (1 - \text{crecimiento con fungicida} / \text{crecimiento sin fungicida}) \times 100$$

Análisis estadístico

Los valores porcentuales de inhibición (germinación de conidias y crecimiento micelar) obtenidos de las pruebas de sensibilidad *in vitro* de *V. inaequalis* a los fungicidas, se analizaron mediante regresiones lineales respecto del logaritmo de las concentraciones de los fungicidas evaluadas. Con la ecuación obtenida se determinó la concentración efectiva mediana (CE_{50}) para cada uno de los aislados para cada fungicida. Con la distribución de las frecuencias de CE_{50} de los aislados se procedió a construir las curvas de sensibilidad de aislados de *V. inaequalis* a los diferentes fungicidas evaluados.

Posteriormente, cada valor CE_{50} tanto de los aislados silvestres como de los de huertos comerciales fueron transformados a logaritmo, y de esta forma ambas poblaciones fueron sometidas a la prueba de normalidad Kolmogorov – Smirnov ($P=0,05$), basado en análisis descrito previamente por Koller *et al* (1997). Los aislados con valores CE_{50} no representativos en cada población fueron excluidos del análisis, cuando presentaron muy bajos coeficientes de determinación en las regresiones no indicando buenos ajustes entre las variables. Según lo propuesto por Smith *et al* (1991), se calculó para cada fungicida el factor más alto de resistencia de la población silvestre (**fr**) (CE_{50} superior / CE_{50} media).

Luego se obtuvieron las sensibilidades promedio de ambas poblaciones (silvestre y de huerto) para cada fungicida y fueron sometidas a un ANDEVA con el objetivo de comparar estadísticamente sus distribuciones y promedios. Con dichos valores y de acuerdo a Mac Hardy (1996), se calculó para cada fungicida el factor de resistencia (**FR**), expresado como la CE_{50} promedio de la población resistente dividida por la CE_{50} promedio de la población sensible.

En base a la información aportada por la población silvestre (línea base) se dedujeron las concentraciones discriminatorias (CD) para cada uno de los activos. Posteriormente, con el propósito de obtener información acerca de la composición de la población de huertos comerciales con respecto a categorías de sensibilidad y/o cambios en la sensibilidad de grupos de fenotipos en relación a la población silvestre, se estimó el impacto de las CDs sugeridas para los activos sobre el crecimiento micelar de cada uno de los aislados de ambas poblaciones (silvestre y de huerto), en base a regresiones ya utilizadas anteriormente para el cálculo de CE_{50} , y así de esta forma estimar crecimiento relativo (CR) definido por Koller *et al.* (1997), para fungicidas IBE, como la relación entre el crecimiento micelar sobre medio enmendado a la CD con fungicida y el crecimiento micelar sobre medio no enmendado, calculado como valor porcentual. Para el caso del activo mancozeb se homologó dicha definición a germinación relativa (GR).

Con los valores obtenidos se construyeron gráficos de barras comparativos de frecuencias de crecimiento y/o germinación relativa de los aislados de ambas poblaciones para cada fungicida, metodología propuesta por Koller *et al.* (1999), como un método de prueba cuantitativo y simple de sensibilidad de aislados. Posteriormente se observó y analizó los cambios en la proporción y magnitud en las frecuencias de aislados entre ambas poblaciones.

RESULTADOS

En la evaluación de sensibilidad de aislados de *V. inaequalis* a mancozeb la inhibición de la germinación de conidias se observó con claridad al microscopio (Figura 1). Para el caso de la evaluación de los fungicidas IBE se observaron claras diferencias en la inhibición del crecimiento micelial entre tratamientos y testigo posterior al período de incubación (Figura 2).

En cuanto a la evaluación de la anilino pirimidina pyrimethanil, a simple vista se observó en los tratamientos un crecimiento micelial de expansión difusa en el medio, razón por lo cual se procedió a medir el diámetro de las colonias a contra luz (Figura 3). Dicha situación no se presentó en los tratamientos con los fungicidas IBE.

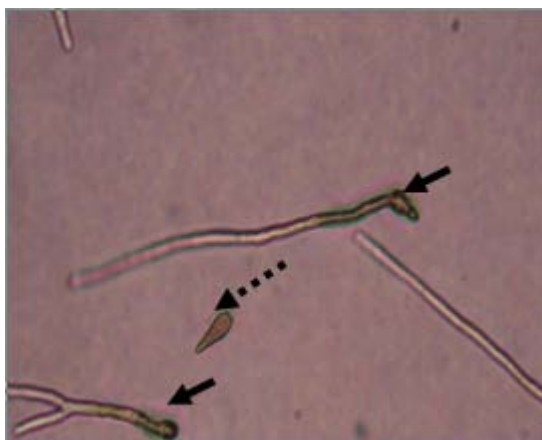


Figura 1. Conidias germinadas de *V. inaequalis* con tubo germinativo elongado y ramificado (flechas continuas), en contraste con una conidia no germinada (flecha discontinua).

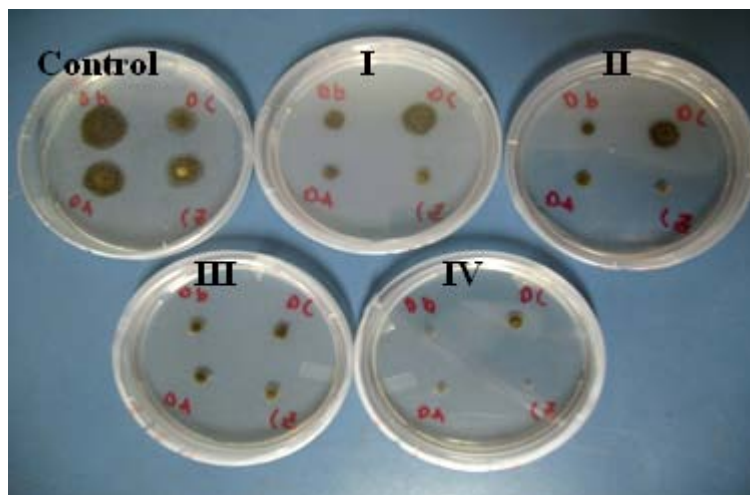


Figura 2. Colonias de 4 cepas de *V. inaequalis* en medio de cultivo enmendado con difenoconazole luego de un período de incubación de 4 semanas. Control; I; II; III; IV, indican el testigo y las concentraciones 0,001; 0,01; 0,1; 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

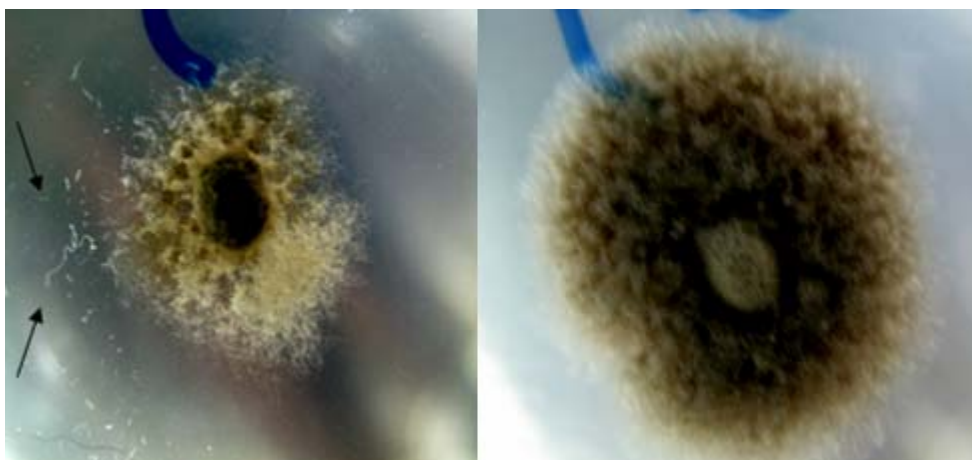


Figura 3. Comparación visual del crecimiento miceliar de *V. inaequalis* entre tratamientos con pyrimethanil (a la izquierda) y fenarimol (a la derecha). La expansión del micelio en el borde de la colonia fue perceptible solamente a contra luz en el medio nutritivo enmendado con pyrimethanil (flechas).

Smith *et al.* (1991), señalan que algunos fungicidas pueden ser muy inestables tras largos períodos de incubación, lo que afecta severamente a los tratamientos de sensibilidad debido a una degradación de la concentración del material activo incorporado en el medio de cultivo. En este estudio, las tasas de crecimiento observadas fueron constantes a través de las 4 semanas de evaluación en los ensayos de crecimiento miceliar, tanto en los medios de agar enmendado como en los no enmendados con fungicidas, indicando que los fungicidas fueron estables a través del tiempo.

Establecimiento de una línea base de sensibilidad de *Venturia inaequalis* a diferentes fungicidas utilizados para el control de la sarna del manzano.

La distribución de frecuencias de sensibilidad de *V. inaequalis*, construida con el logaritmo de las CE_{50} de los aislados provenientes de manzanos sin tratamiento anterior con fungicidas, fue de tipo lognormal simple para los activos evaluados de acuerdo a la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov; para mancozeb, difenoconazole, fenarimol y pyrimethanil, ($P > 0,15$); ($P = 0,12$); ($P = 0,05$); ($P = 0,08$) respectivamente (Figuras 4 y 5).

Mancozeb: La sensibilidad en la población silvestre fluctuó entre 0,046 y 6,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presentando un factor de separación de 141 (valor CE_{50} superior / por valor CE_{50} inferior) (Smith *et al.*, 1991). Con el propósito de obtener información representativa del comportamiento de la población, se analizó una distribución compuesta por un 94% de los aislados ($n = 47$). La sensibilidad promedio de la población resultó 0,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se estableció como la sensibilidad promedio de la línea base de *V. inaequalis* a mancozeb. Con el valor anterior, el factor más alto de resistencia (**fr**) en la población de aislados silvestres correspondió a 14 (Cuadro 4).

Basado en estudios anteriores de Smith *et al.* (1991) y Koller *et al.* (1991), se estableció una CD capaz de monitorear *in vitro* la disminución de sensibilidad de una población de *V. inaequalis* a mancozeb en base a crecimiento relativo a testigos. Koller *et al.* (1991), señalan que una CD de monitoreo corresponde a una concentración ligeramente más alta que la sensibilidad promedio de la población línea base. En consecuencia, se sugirió una CD de 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, la que se dedujo considerando dentro del rango de aislados sensibles a un grupo importante de aislados (19,1% de la población) con una CE_{50} levemente superior a la media poblacional (Figura 4A).

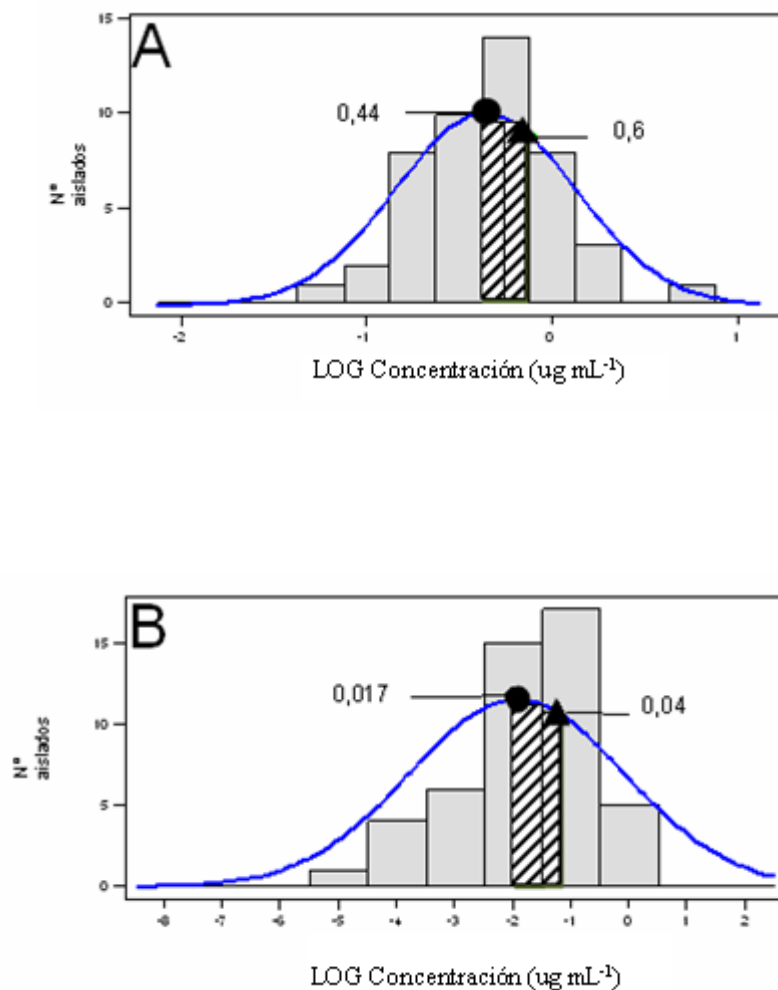


Figura 4. Distribución de frecuencias construida con el logaritmo de las CE_{50} para mancozeb (A) y difenoconazole (B) determinada para aislados monoconidiales silvestres de *V.inaequalis* colectados en localidades entre la VII y IX regiones.

(●) Valor CE_{50} promedio de la población, (▲) Concentración discriminatoria (CD) sugerida en este estudio, indicados junto a la curva de distribución lognormal. Las barras estriadas representan frecuencias altas de aislados levemente menos sensibles que la sensibilidad promedio de la población, ubicadas bajo la CD establecida para cada fungicida.

Difenoconazole: La sensibilidad de los aislados de la población base para este fungicida fluctuó entre 0,00001 y 2,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ evidenciando una amplitud de separación de factor 290.000. La población analizada incluyó un 94,2 % de los aislados evaluados con el fin de encontrar información representativa del comportamiento en el conjunto de aislados ($n = 48$). El valor promedio de sensibilidad de la población fue 0,017 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Con este valor, el **(fr)** correspondió a 170 (Cuadro 4).

Se sugirió una CD de 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dicho valor se dedujo considerando la sensibilidad de un grupo importante de aislados (16,6% de la población) levemente menos sensibles que la sensibilidad promedio de la línea base (Figura 4B).

Fenarimol: La sensibilidad de los aislados de la población base para este activo fluctuó entre 0,0003 y 1,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ evidenciando una amplitud de separación de factor 4.666. La población analizada incluyó un 98% de los aislados evaluados con el fin de obtener información representativa ($n = 49$). El valor de sensibilidad promedio de la población resultó 0,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De acuerdo con ello el **(fr)** tuvo un valor de 15,5 (Cuadro 4)

Para este fungicida se sugirió una CD de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dicho valor se dedujo considerando la sensibilidad de un grupo importante de aislados (12,2% de la población) levemente menos sensibles que la media poblacional (Figura 5A).

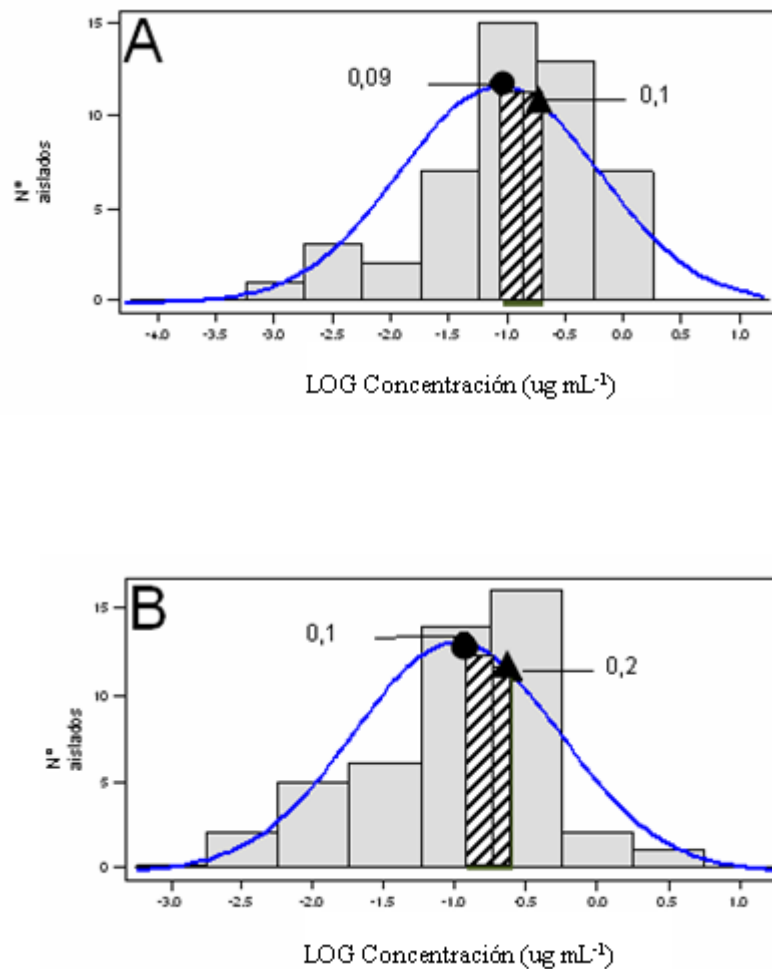


Figura 5. Distribución de frecuencias construida con el logaritmo de los valores CE_{50} para fenarimol (A) y pyrimethanil (B) determinado para aislados monoconidiales silvestres de *V. inaequalis* colectados en localidades entre la VII y IX regiones.

(●) Valor CE_{50} promedio de la población, (▲) Concentración discriminatoria (CD) sugerida, indicados junto a la curva de distribución lognormal. Las barras estriadas representan frecuencias altas de aislados levemente menos sensibles que la sensibilidad promedio de la población, ubicadas bajo la CD establecida para cada fungicida.

Pyrimethanil: La sensibilidad de los aislados de la población base para este fungicida fluctuó entre 0,0037 y 2,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ evidenciando una amplitud de separación de factor 621. La población analizada incluyó un 96% de los aislados evaluados con el fin de obtener información representativa ($n = 48$). El valor de sensibilidad promedio de la población fue 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En consecuencia el (**fr**) tuvo un valor de 23 (Cuadro 4).

Para este fungicida se sugirió una CD de 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el monitoreo *in vitro* de la disminución de sensibilidad de una población de *V. inaequalis*. Dicho valor se dedujo considerando la sensibilidad de un grupo importante de aislados (22,9% de la población) levemente menos sensibles que la media poblacional (Figura 5B).

Cuadro 4. Descripción de la distribución de sensibilidad de aislados silvestres de *V. inaequalis* a los fungicidas evaluados en este estudio.

Fungicidas	CE ₅₀ ($\mu\text{g /mL}^{-1}$)			Variación en la población	
	Rango	Promedio ^a	CD ^b	Coficiente de variación ^c	Factor de resistencia ^d (fr)
Mancozeb	0,046 – 6,5	0,44	0,6	5,4	14
Difenoconazole	0,00001- 2,9	0,017	0,04	858	170
Fenarimol	0,0013 – 1,4	0,09	0,1	62	15,5
Pyrimethanil	0,0037 – 2,3	0,10	0,2	40	23

^a Promedios de CE₅₀ determinados para aislados monoconidiales.

^b Concentraciones discriminatorias propuestas en este estudio.

^c Desviación típica dividida por la media aritmética de la población (medida de dispersión)

^d CE₅₀ más alta dividida por la CE₅₀ promedio (factor de resistencia más alto alojado en la población).

Determinación de la sensibilidad a fungicidas de una población de aislados de *Venturia inaequalis* provenientes de huertos comerciales bajo constante uso de fungicidas.

La distribución de frecuencias de sensibilidad de los aislados de *V. inaequalis*, provenientes de huertos comerciales bajo constante uso de fungicidas, fue de tipo lognormal simple para los activos evaluados de acuerdo a la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov; para mancozeb, difenoconazole, pyrimethanil ($P > 0,15$); y para fenarimol ($P > 0,10$). Los porcentajes de población representativa incluidos y analizados en las distribuciones para cada fungicida fueron 100, 100, 98 y 94 respectivamente.

Mancozeb: La sensibilidad de los aislados de la población de huertos comerciales, evaluada como CE_{50} , fluctuó entre 0,0046 y 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6), lo que implicó una amplitud de separación de factor 2.456. El valor de la sensibilidad promedio de la población resultó 0,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y fue significativamente más alta ($P= 0,001$) que el de la sensibilidad promedio de aislados silvestres a mancozeb (0,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtenido en este estudio (Figura 7). La comparación de las sensibilidades promedio de la población de huerto y silvestre resultó en un factor de resistencia (**FR**) de valor 2,1 como indicador de nivel de resistencia para este fungicida.

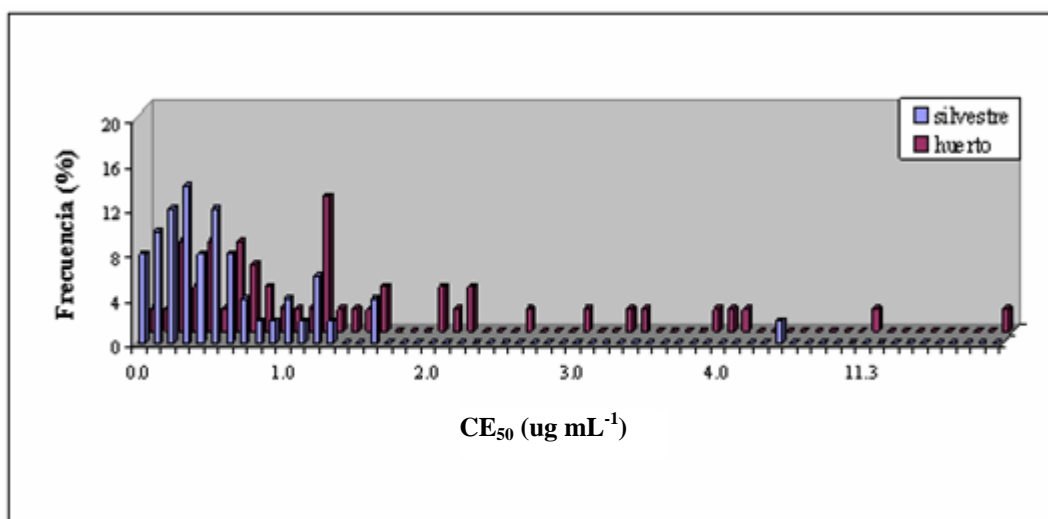


Figura 6. Distribución de frecuencias de sensibilidad (CE_{50}) de aislados de *V. inaequalis* a mancozeb. Aislados de huertos comerciales (barras rojas) y aislados silvestres de manzanos no tratados previamente con fungicidas (barras azules).

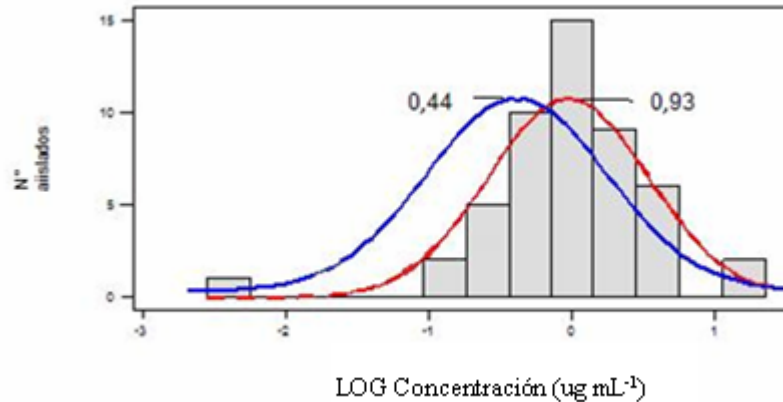


Figura 7. Distribución de frecuencias del logaritmo de los valores CE_{50} para mancozeb (barras) y su curva de distribución lognormal (curva roja), determinada para aislados monoconidiales de *V. inaequalis* colectados de huertos comerciales. En comparación la curva de distribución lognormal de la población silvestre (curva azul) y su sensibilidad promedio línea base.

Los valores de GR, estimados con la CD ($0,6 \text{ ug mL}^{-1}$), de los aislados de la población silvestre, evidenciaron una distribución normal y unimodal según el test Kolmogorov-Smirnov ($P > 0,15$). La distribución presentó un promedio de $GR = 45$. Por otro lado la población de huerto, fue unimodal, mostró normalidad ($P > 0,15$) y presentó un promedio de $GR = 57$. Un ANDEVA mostró diferencias significativas entre los promedios de ambas distribuciones ($P < 0,0001$).

La construcción de un gráfico de barras comparativo, de frecuencias de GR de ambas poblaciones, evidenció que las frecuencias de aislados de huertos comerciales con valores $GR > 50$ aumentaron en comparación a las de aislados de la línea base (Figura 8). No obstante, la magnitud de tales aumentos no fue uniforme. La mayor magnitud del aumento en las frecuencias se observó en la de aislados con $GR = 70$, con una proporción 8 veces mayor que la frecuencia presente en la línea base (Figura 9). En adición a lo anterior, un 6% de la población de huerto se presentó con $GR = 80$, constituyendo una frecuencia emergente (no presente en la población línea base). En relación a las frecuencias de aislados de huerto con valores $GR < 50$, se observó una significativa disminución en comparación a la población silvestre, desapareciendo casi por completo las frecuencias con $GR = 10$ y 20 .

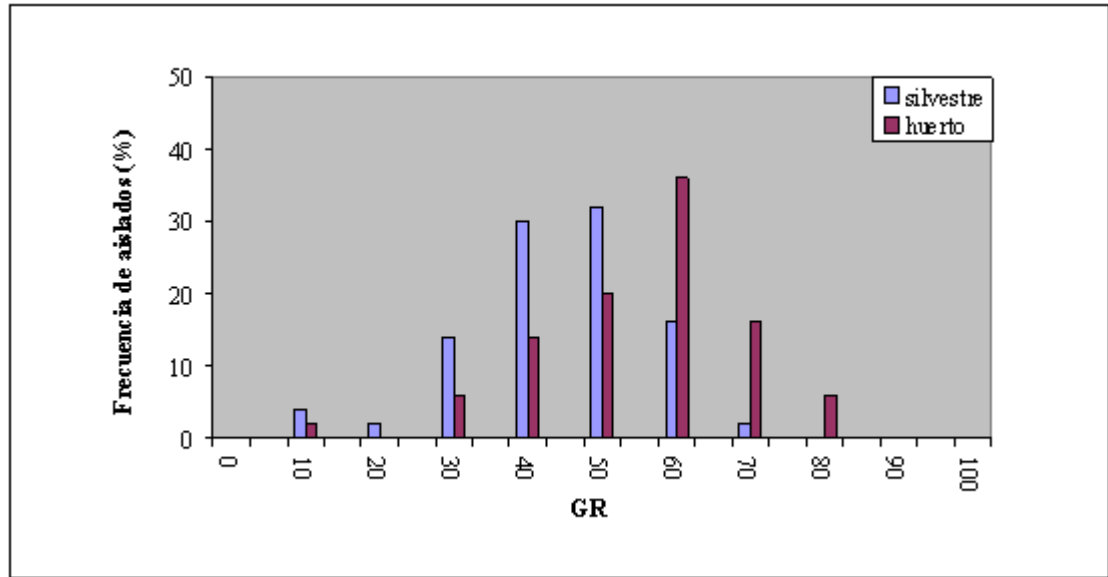


Figura 8. Distribución porcentual de frecuencias de sensibilidad de aislados silvestres y de huerto de *V. inaequalis* a mancozeb. Las sensibilidades fueron estimadas como valores de germinación relativa (GR) determinados con una concentración discriminadora de $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

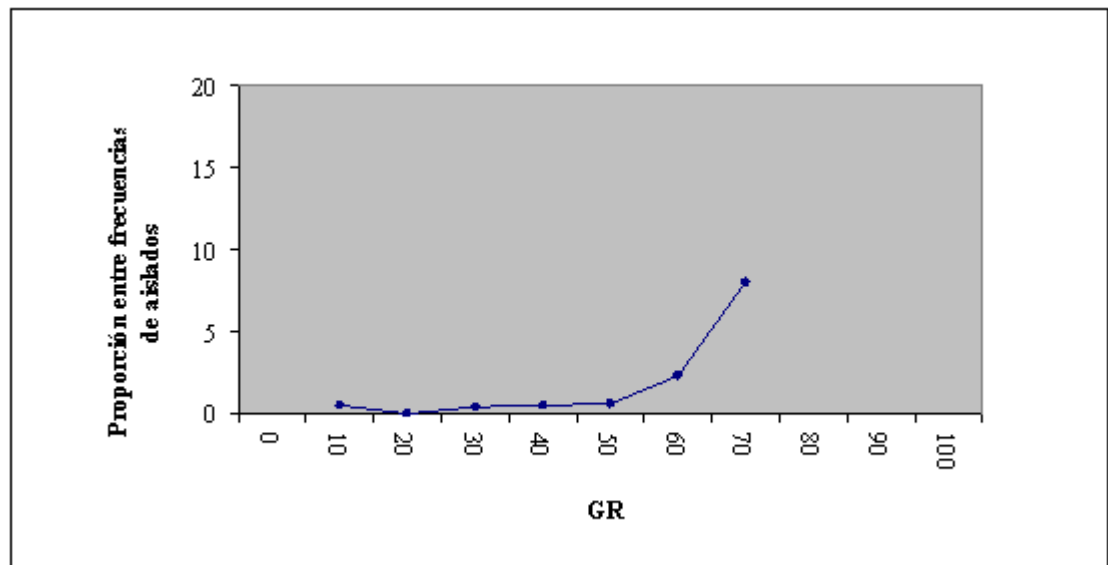


Figura 9. Dinámica de las frecuencias de sensibilidad a mancozeb de aislados obtenidos de huertos comerciales en relación a las frecuencias de aislados en la línea base. La proporción de frecuencias corresponde al cociente entre las frecuencias de aislados de huertos comerciales y aislados silvestres. La inclinación de la curva en $\text{GR} = 60$ refleja una no despreciable magnitud en el incremento de las frecuencias de aislados de huerto con respecto a la línea base.

Difenoconazole: Para este fungicida las CE_{50} de la población de aislados obtenidos de huertos comerciales fluctuaron entre 0,0002 a $5,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ evidenciando una amplitud de separación de factor 29.000 (Figura 10). La sensibilidad promedio de la población fue $0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor que resultó más alto que la sensibilidad promedio de la línea base de *V. inaequalis* a difenoconazole ($0,017 \mu\text{g mL}^{-1}$) obtenida en este estudio (Figura 11). Un ANDEVA a ambas poblaciones (silvestre y de huerto) mostró diferencias significativas entre sus sensibilidades promedio ($P = 0,002$). La comparación de las sensibilidades promedio de la población de huerto y silvestre resultó en un (**FR**) de 4,7 como indicador de nivel de resistencia.

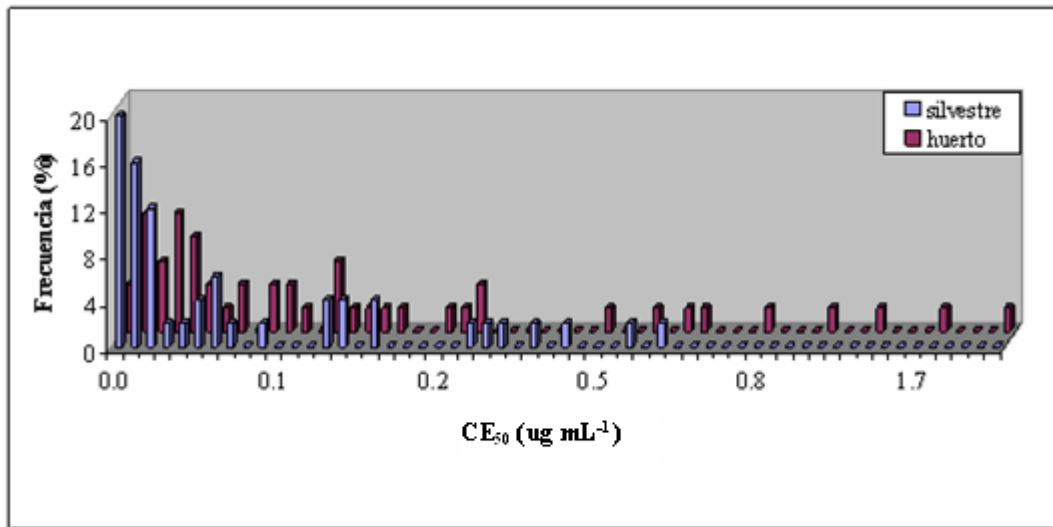


Figura 10. Distribución de frecuencias de sensibilidad (CE_{50}) de aislados de *V. inaequalis* a difenoconazole. Aislados de huertos comerciales (barras rojas) y aislados de manzanos silvestres (barras azules) o no tratados previamente con fungicidas.

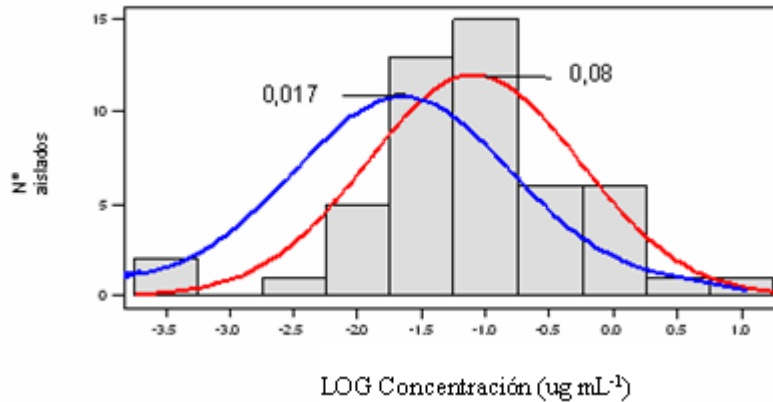


Figura 11. Distribución de frecuencias del logaritmo de los valores CE_{50} para difenoconazole (barras) y su curva de distribución lognormal (curva roja), determinado para aislados monoconidiales de *V. inaequalis* colectados de huertos comerciales. En comparación la curva de distribución lognormal de la población silvestre (curva azul) y su sensibilidad promedio línea base.

Los valores de CR del micelio, estimados con la CD ($0,04 \text{ ug mL}^{-1}$), de todos los aislados de la población silvestre evidenciaron una distribución normal y unimodal según el test Kolmogorov-Smirnov ($P > 0,15$) y exhibieron un promedio de $CR = 48$. Por otra parte la población de huerto, fue unimodal, mostró normalidad ($P > 0,15$) y presentó un promedio de $CR = 54$, resultando significativamente menos sensible ($P = 0,012$) que la población silvestre o línea base.

La construcción de un gráfico comparativo de frecuencias de CR de ambas poblaciones, evidenció que hubo aumentos en las frecuencias de aislados de huertos comerciales con valores $CR > 40$ en comparación a las frecuencias de los aislados de la línea base. Sin embargo la magnitud de dichos aumentos fue baja y no uniforme. En relación a lo anterior, la frecuencia de aislados con $CR = 60$, a diferencia de las presentes para los $CR = 50$ y 70 , fue levemente más baja (16,3 %) que lo observado en la línea base (21 %). En adición, no se observaron frecuencias emergentes (Figura 12). La mayor magnitud del aumento en las frecuencias se observó en las correspondientes a los aislados con $CR > 70$, con una proporción 2,68 veces mayor que la presente en la línea base (Figura 13). En relación a las frecuencias de aislados de huerto con valores $GR < 40$, se observó una leve disminución en comparación a la población silvestre.

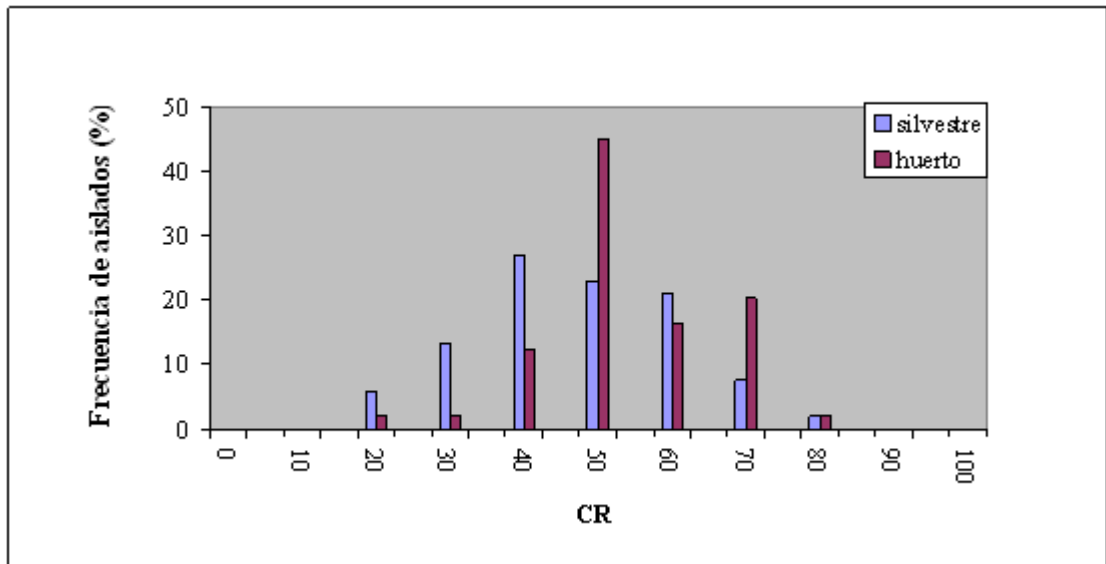


Figura 12. Distribución porcentual de frecuencias de sensibilidad de aislados silvestres y de huerto de *V. inaequalis* a difenoconazole. Las sensibilidades fueron estimadas como valores de crecimiento relativo (CR) determinados a una concentración discriminadora de $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$.

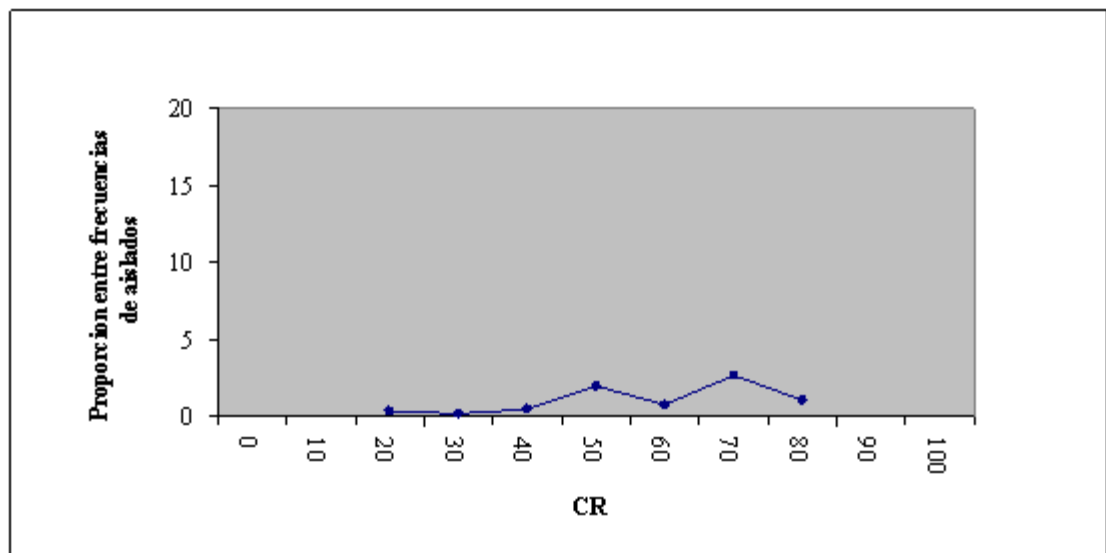


Figura 13. Dinámica de las frecuencias de sensibilidad a difenoconazole de aislados obtenidos de huertos comerciales en proporción a las frecuencias de aislados en la línea base. La proporción de frecuencias corresponde al cociente entre frecuencias de aislados de huertos comerciales y aislados silvestres.

Fenarimol: Para este fungicida las CE_{50} de la población de aislados obtenidos de huertos comerciales fluctuaron entre 0,0048 y 5,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ evidenciando una separación de factor 1.062 (Figura 14). La sensibilidad promedio de la población fue 0,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y resultó más alta que la sensibilidad promedio de la línea base de *V. inaequalis* a fenarimol (0,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtenida en este estudio (Figura 15). Un ANDEVA a ambas poblaciones (silvestre y de huerto) mostró diferencias significativas ($P < 0,001$). El cálculo del (**FR**) indicado por la comparación entre las sensibilidades promedio de ambas poblaciones arrojó un valor de 5,8.

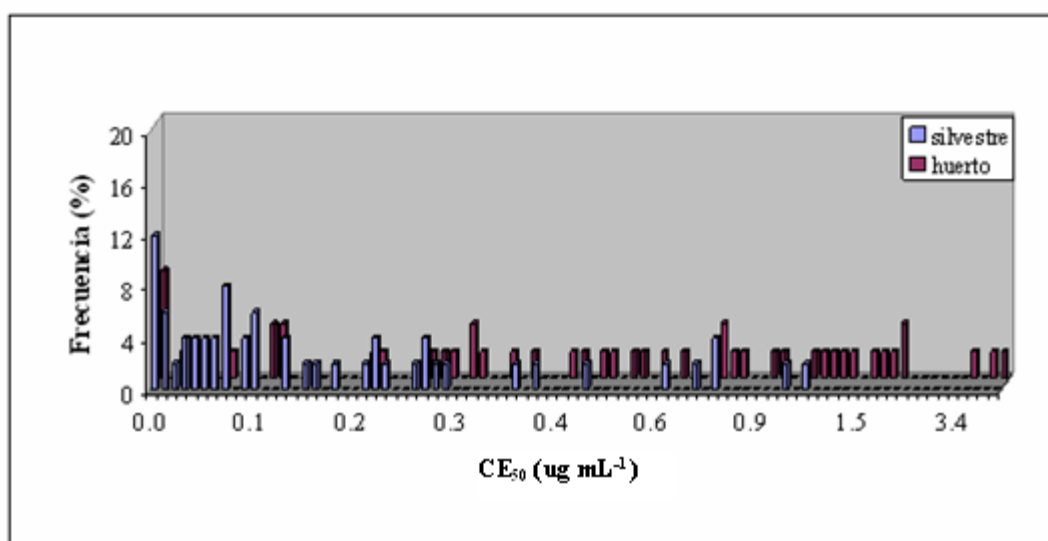


Figura 14. Distribución de frecuencias de sensibilidad (CE_{50}) de aislados de *V. inaequalis* a fenarimol. Aislados de huertos comerciales (barras rojas) y aislados de manzanos silvestres (barras azules) no tratados previamente con fungicidas.

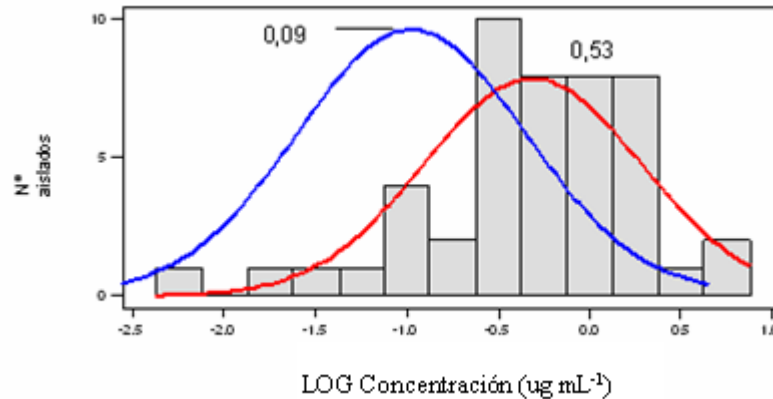


Figura 15. Distribución de frecuencias del logaritmo de los valores CE_{50} para fenarimol (barras) y su curva de distribución lognormal (curva roja), determinado para aislados monoconidiales de *V. inaequalis* colectados de huertos comerciales. En comparación la curva de distribución lognormal de la población silvestre (curva azul) y su sensibilidad promedio.

Los valores de CR del micelio, estimados con la CD ($0,1 \text{ ug mL}^{-1}$), de todos los aislados de la población silvestre evidenciaron una distribución normal y unimodal según el test Kolmogorov-Smirnov ($P > 0,15$) y exhibieron un promedio de $CR = 50$. En cuanto a la población de huerto, fue unimodal, mostró normalidad ($P = 0,05$) y presentó un promedio de $CR = 65$, en efecto fue significativamente menos sensible ($P < 0,001$) que la población silvestre o línea base.

La construcción de un gráfico comparativo de frecuencias de CR de ambas poblaciones, evidenció que las frecuencias de aislados de huertos comerciales con valores $CR > 60$ aumentaron en comparación a las correspondientes a los aislados de la línea base (Figura 16). No obstante, y en relación a lo anterior, la magnitud de dichos aumentos no fue uniforme. La mayor magnitud del aumento en las frecuencias se observó en las de aislados con $GR = 80$, con una proporción 18,9 veces mayor que las presentes en la línea base (Figura 17). En adición a lo anterior, un 4 % de la población de huerto se presentó con $GR = 90$, constituyendo frecuencias emergentes (no presentes en la población línea base). En relación a las frecuencias de aislados de huerto con valores $GR < 60$, se observó una clara disminución en comparación a la población silvestre, desapareciendo por completo las frecuencias con $GR = 20$ (Figura 16).

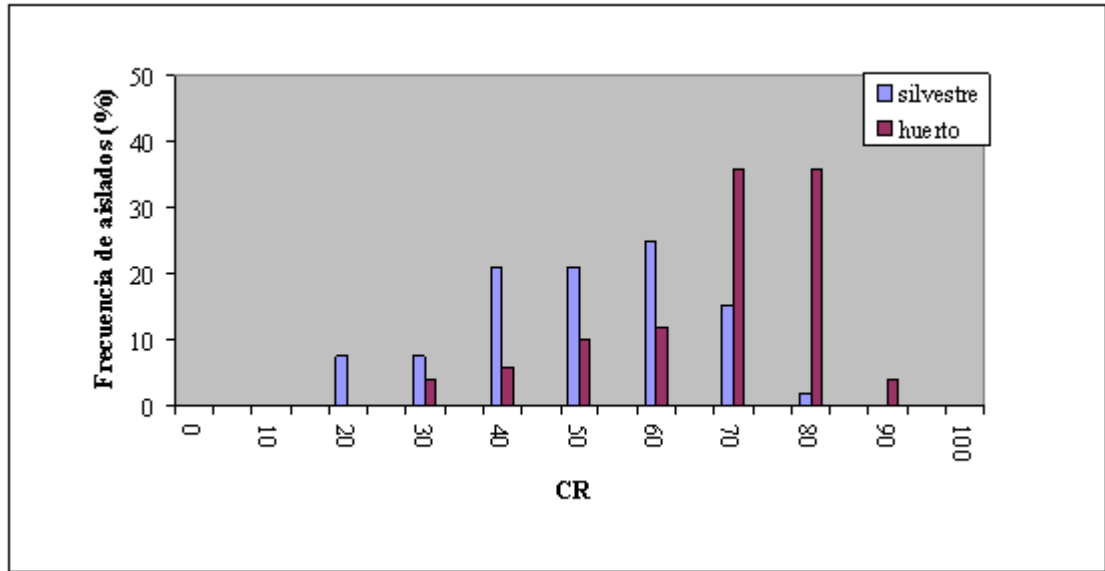


Figura 16. Distribución porcentual de frecuencias de sensibilidad de aislados silvestres y de huerto de *V. inaequalis* a fenarimol. Las sensibilidades fueron estimadas con valores de crecimiento relativo (CR) determinados a una concentración discriminadora de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

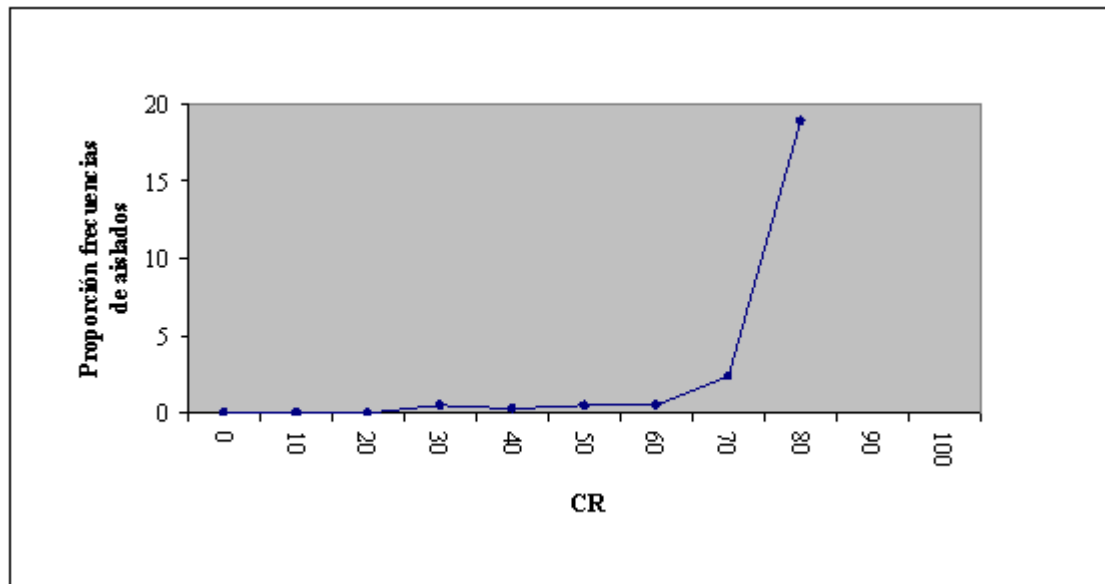


Figura 17. Dinámica de las frecuencias de sensibilidad a fenarimol de aislados obtenidos de huertos comerciales en relación a las frecuencias de aislados en la línea base. La proporción de frecuencias de aislados, corresponde al cociente entre las frecuencias de aislados de huertos comerciales y aislados silvestres. La inclinación de la curva en el $\text{CR} = 70$ refleja una no despreciable magnitud del incremento en las frecuencias de aislados de huerto con respecto a la línea base.

Pyrimethanil: En este caso las CE_{50} de la población de aislados obtenidos de huertos comerciales fluctuaron entre 0,0061 y 3,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ evidenciando una separación de factor 524 (Figura 18). La sensibilidad promedio de la población fue de 0,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, siendo levemente mayor que la sensibilidad promedio de la línea base de *V. inaequalis* a pyrimethanil (0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtenida en este estudio (Figura 19). Un ANDEVA a ambas poblaciones no mostró diferencias significativas ($P = 0,26$) evidenciando que ambas poblaciones fueron similares. El cálculo del FR mediante la comparación entre las sensibilidades promedio de ambas poblaciones arrojó un valor de 1,4.

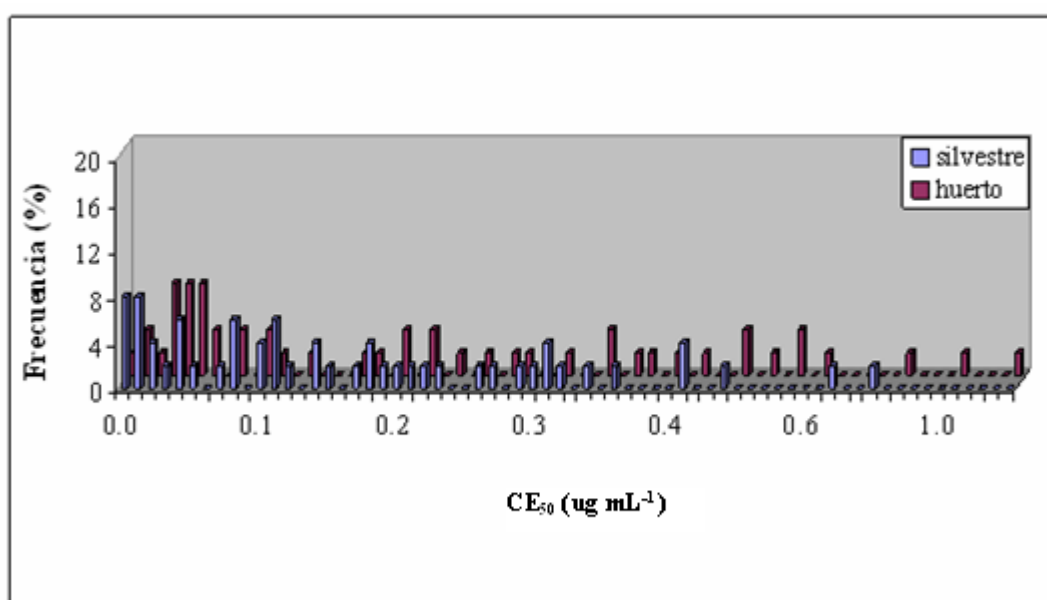


Figura 18 Distribución de frecuencias de sensibilidad (CE_{50}) de aislados de *V. inaequalis* a pyrimethanil. Aislados de huertos comerciales (barras rojas) y aislados de manzanos silvestres (barras azules) no tratados previamente con fungicidas.

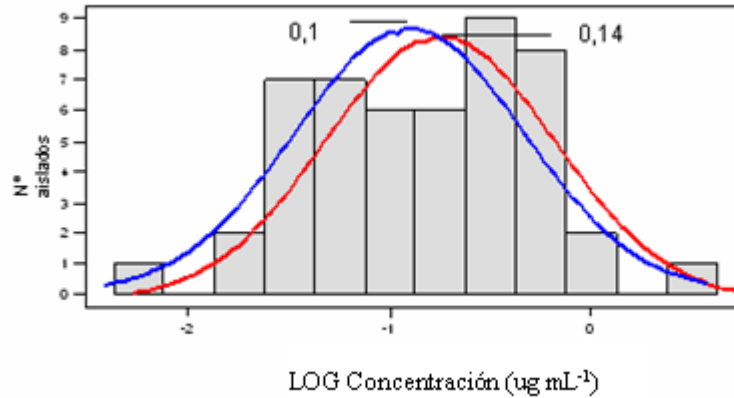


Figura 19. Distribución de frecuencias del logaritmo de los valores CE_{50} para pyrimethanil (barras) y su curva de distribución lognormal (curva roja), determinado para aislados monoconidiales de *V. inaequalis* colectados de huertos comerciales. En comparación la curva de distribución lognormal de la población silvestre (curva azul) y su sensibilidad promedio.

Los valores de CR del micelio, estimados con la CD ($0,2 \text{ ug mL}^{-1}$), de todos los aislados de la población silvestre evidenciaron una distribución línea base normal y unimodal según el test Kolmogorov-Smirnov ($P > 0,15$) y exhibieron un promedio de $CR = 43$. Por otro lado la población de huerto, fue unimodal, mostró normalidad ($P = 0,05$) y presentó un promedio de $CR = 46$, en efecto no fue significativamente diferente y por ende no menos sensible ($P = 0,22$) que la población silvestre o línea base.

La construcción de un gráfico comparativo de frecuencias de ambas poblaciones, evidenció para los aislados de huertos comerciales, en relación a los aislados de la línea base, que hubo una disminución en las frecuencias de aislados más sensibles ($CR = 10$ y 20), y a la vez, aumentos en las frecuencias de $CR = 30$ y 60 . Cabe destacar, además, la ausencia de frecuencias de $CR = 70$ en comparación a un 2 % presente en la línea base (Figura 20). No obstante a lo mencionado, dichos aumentos fueron de baja significancia (Figura 21).

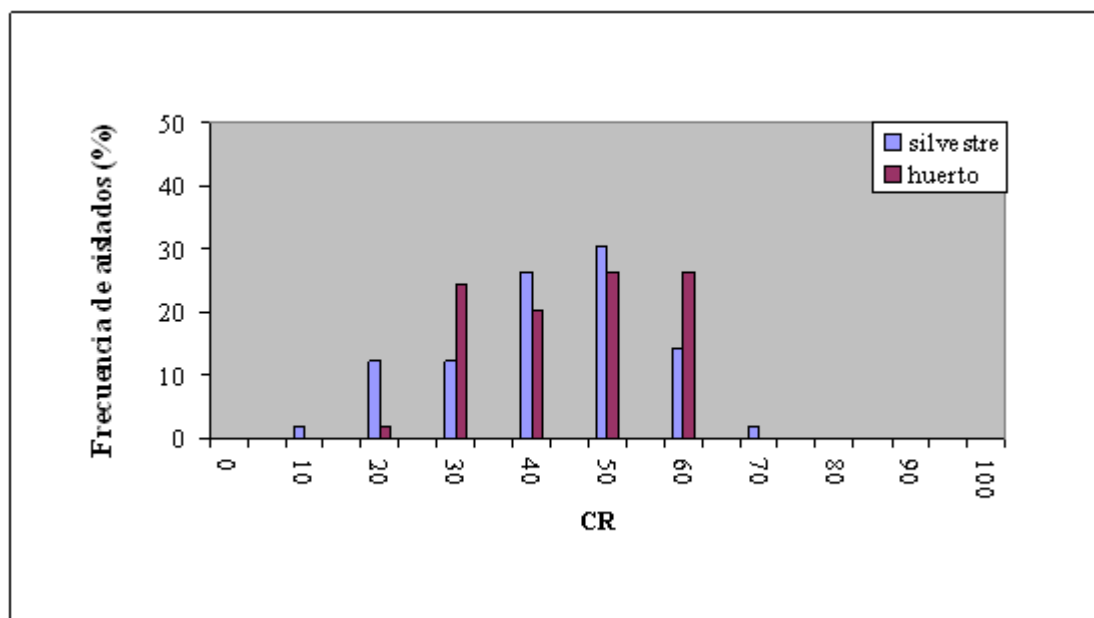


Figura 20. Distribución porcentual de frecuencias de sensibilidad de aislados silvestres y de huerto de *V. inaequalis* a pyrimethanil. Las sensibilidades fueron estimadas con valores de crecimiento relativo (CR) determinados a una concentración discriminadora de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

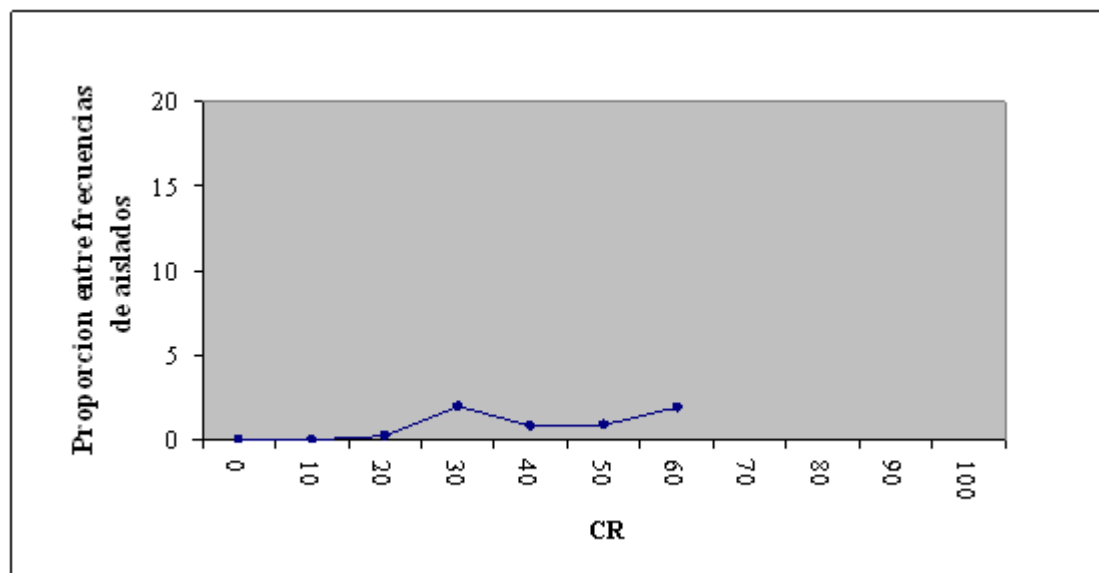


Figura 21. Dinámica de las frecuencias de sensibilidad a pyrimethanil de aislados obtenidos de huertos comerciales en proporción a las frecuencias de aislados en la línea base. La proporción de frecuencias de aislados corresponde al cociente entre frecuencias de aislados de huertos comerciales y aislados silvestres.

DISCUSIÓN

Este estudio no se orientó a definir grupos de aislados “resistentes”, sin embargo, permitió con el conocimiento de la sensibilidad de una población basal del patógeno, evaluar la pérdida de sensibilidad de una población de aislados de huertos comerciales bajo constante aplicación de fungicidas.

Mancozeb: La sensibilidad de los aislados de la población basal tuvo una distribución de rango estrecho (<150) para este activo en comparación a los demás fungicidas evaluados en este estudio, esto en complemento con un bajo coeficiente de variación (5,4) ilustra una baja variabilidad y dispersión de las respuestas del patógeno al fungicida. En relación a lo anterior Uesugi (2002) señala que mancozeb es un fungicida que actúa sobre múltiples puntos en el organismo (inhibidor multisitio), con lo que este modo de acción restringiría y concentraría la variabilidad de las respuestas de los aislados de una población, a diferencia de lo que ocurre con los fungicidas inhibidores de acción sitio específico, en donde la capacidad de respuesta del patógeno es más diversa.

Por otro lado, las sensibilidades de los aislados de huertos comerciales presentaron una distribución de rango de amplitud media (>2000) mayor que el rango mostrado por los aislados de la línea base. Esta situación se debió, principalmente, a la emergencia de fenotipos individuales menos sensibles totalmente aislados en un extremo de la distribución, siendo poco representativos del común de la población, sin embargo de presencia no despreciable.

El (**FR**) reflejó que el valor CE_{50} promedio de la población de huerto ($0,93 \text{ ug mL}^{-1}$) fue en proporción 2,1 veces mayor que el correspondiente a la línea base. En relación a estudios de sensibilidad realizados con dodine, fungicida multisitio también utilizado para el control de la sarna, se ha demostrado que aislados de *V. inaequalis* de huertos de manzanos comerciales, en los cuales dodine ha fallado en el control de la enfermedad, comúnmente fueron entre 2 a 4 veces menos sensibles que los aislados provenientes de huertos sin previa exposición al activo (McHardy, 1996). No obstante la concordancia de esta información con lo obtenido en este estudio, dicho índice solo permite visualizar en forma generalizada que hubo cierta pérdida de sensibilidad de la población de huertos al activo sin tomar en cuenta la dinámica y/o composición de la sensibilidad de grupos de aislados en particular.

La estimación posterior realizada en este estudio, basada en GR a la CD obtenida ($0,6 \text{ ug mL}^{-1}$), permitió obtener información sobre la pérdida de sensibilidad observada en la población de aislados de huertos comerciales evidenciada por un bajo, aunque no menos importante, factor de resistencia. El aumento de las frecuencias con valores de GR >50 evidenció el desplazamiento de toda la población de huertos hacia un nuevo equilibrio de menor sensibilidad. En relación a la mayor magnitud del aumento, observado en las

frecuencias de GR =70, Koller *et al.* (1999), señalan para estudios realizados con dodine, que los aumentos más pronunciados fueron observados en las frecuencias con GR >90. Sin embargo, la población analizada en dicho estudio provino de huertos individuales con resistencia práctica confirmada de *V. inaequalis* al activo, a diferencia de la analizada en el presente estudio para mancozeb que solo cumplió con el requisito de estar sometida a una presión de selección por parte de fungicidas. Esto último explicaría las diferencias en la magnitud de los aumentos de frecuencias.

Relevante también fue la presencia de una pequeña frecuencia de aislados con GR =80 (no presentes en la población línea base) que da indicio de la alteración fenotípica provocada por el uso intensivo del fungicida. Sin embargo hay que destacar que una evaluación individual de huertos comerciales específicos con antecedentes de control insatisfactorio de la sarna, reflejaría posiblemente cambios cuantitativos de mayor magnitud que los obtenidos en este estudio.

En adición a lo anterior, actualmente a este fungicida se le da muy poco uso individual para el control de la sarna del manzano en comparación a décadas anteriores, por lo que posiblemente los aislados de huertos no están sometidos a una presión de selección constante que desestabilice el equilibrio de la población. Uesugi (2002) sostiene que los ditiocarbamatos son fungicidas antiguos pero que aún son utilizados para el control de algunas enfermedades no cubiertas por el espectro de acción de los fungicidas modernos, de esta manera son frecuentemente utilizados en mezclas con fungicidas sistémicos modernos. Esta información refleja la disminución del uso del activo en cuanto a dosis y exposición en huertos, lo que explicaría la diferenciación moderada entre las poblaciones de huerto y silvestre evaluadas en este estudio.

Difenoconazole: Se detectó una alta variabilidad (factor de separación >200.000) y dispersión en la sensibilidad de los aislados silvestres de *V. inaequalis* (elevado coeficiente de variación), además de la presencia de fenotipos naturales de muy baja sensibilidad (**fr** >100). El comportamiento observado es característico de una población del patógeno no antes expuesta a este tipo de activo, y evidencia la no existencia de una presión de selección del fungicida. En relación a lo anterior Koller *et al.* (1991), señalan que una distribución de amplio rango de sensibilidades puede ser ventajosa en una situación de incremento de frecuencias de aislados resistentes a fungicidas IBE debida a una presión de selección, ya que correspondería a un proceso menos abrupto y severo en comparación a lo que podría ocurrir en distribuciones estrechas de baja variabilidad de sensibilidades.

La baja sensibilidad basal promedio de *V. inaequalis* a difenoconazole, indicó una alta actividad intrínseca *in vitro* y en comparación al activo IBE fenarimol, también evaluado en este estudio, presentó una acción mayor contra el patógeno, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Kunz *et al.* (1997a).

Por otra parte, la sensibilidad de los aislados provenientes de huertos comerciales presentó una distribución de rango amplio (>10.000), no obstante notoriamente más estrecha en comparación a la distribución de las sensibilidades de la población línea base, lo que evidencia una importante pérdida en la variabilidad de respuesta del patógeno frente al activo al desaparecer los aislados más sensibles en la población original. Koller *et al.* (1991), señalan que en una distribución de sensibilidades a fungicidas IBE de rango estrecho, existe una alta probabilidad de que la proporción de fenotipos resistentes, se desplace más allá de un nivel umbral de control satisfactorio de la enfermedad. En consideración a que este fungicida es relativamente nuevo, según Álvarez y Pinilla (2002), alrededor de 10 años en el mercado, es posible señalar que con el uso intensivo a través del tiempo, la distribución de sensibilidades de los aislados continuaría estrechándose y podría llegar a niveles de control insatisfactorio.

El FR de valor 4,7 que representa el cambio en la sensibilidad de la población de huertos, es comparable a lo observado por Smith *et al.* (1991), que sostiene que cambios en los valores CE_{50} promedios en poblaciones de huertos comerciales con respecto a una línea base, representados por factores de resistencia de 3 a 4, serían índices suficientes para considerar disminución de la acción en campo de un fungicida IBE. En adición, Kunz *et al.* (1997b), señalan que la acción de fungicidas con mayor actividad intrínseca incrementaría también la presión de selección e induciría mayores niveles de resistencia. Esta información explicaría el alto valor de (FR) obtenido para el activo en este estudio, no obstante, este indicador solo permite generalizar que hubo cierta pérdida de sensibilidad de la población de huertos al activo sin considerar aspectos de la dinámica de la sensibilidad de los grupos de aislados analizados.

Por otra parte, la estimación de la sensibilidad de los aislados realizada posteriormente, basada en CR a la CD establecida ($0,04 \text{ ug mL}^{-1}$), permitió detectar leves variaciones en las frecuencias de los aislados en la población de huerto con respecto a las presentes en la población línea base. De esta forma se observó, una disminución de aislados de mayor sensibilidad y leves aumentos en las frecuencias de sensibilidad menores. Asimismo, es posible sostener que la sensibilidad de *V. inaequalis* para este fungicida presentó una tendencia a concentrarse y que desplazamientos de grupos de aislados de menor sensibilidad no fueron evidentes. Lo anterior concuerda con lo observado por Rosenberger and Cox (2010) para aislados norteamericanos. En relación a esta dinámica poblacional, McHardy (1996) señala que los patrones de genotipo de la población de un patógeno dado, responderá frente a la acción de un activo hasta una selección estable que dará como resultado un nuevo equilibrio.

La CD establecida de valor $0,04 \text{ ug mL}^{-1}$ contrasta con la utilizada en estudios por Rosenberger and Cox (2010) de valor $0,1 \text{ ug mL}^{-1}$, sin embargo los autores reconocen haber trabajado con la misma CD propuesta para otro activo del mismo grupo químico (myclobutanil), y que a la vez, según los resultados obtenidos y la alta actividad intrínseca que presenta difenoconazole la CD debería ser bastante menor.

Fenarimol: La sensibilidad de los aislados silvestres de *V. inaequalis* se distribuyó en un rango amplio de factor de separación (>1000), valor que discrepa con el factor 60 obtenido por Koller *et al.* (1991). Esta diferencia de más de 16 veces se explica por la presencia de una gran proporción de fenotipos menos sensibles en la población evaluada en este estudio, en comparación a la población utilizada por Koller *et al.* (1991), ilustrando una distribución amplia con una alta variabilidad y dispersión de las sensibilidades al activo. Este comportamiento indica diferencias importantes entre la sensibilidad de aislados silvestres chilenos y estadounidenses (Nueva York) de *V. inaequalis*.

La sensibilidad (CE_{50}) promedio de la población línea base ($0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$) obtenida en este estudio difiere de otras reportadas previamente. La sensibilidad CE_{50} promedio reportada por Fiaccadori *et al.* (1987), para fenarimol obtenida de aislados provenientes de huertos sin exposición a fungicidas de Italia y Holanda fue de $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor que coincide con lo reportado por Koller *et al.* (1991) para aislados de Nueva York. Ligeramente más baja pero muy similar a los datos anteriores fue la sensibilidad línea base reportada por Thind *et al.* (1986), con un valor de $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$. En contraste, Hermann *et al.* (1989) y Stanis y Jones (1985) reportaron un valor CE_{50} de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que por otro lado Kunz *et al.* (1997a), reportaron un valor de $0,96 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Las discrepancias entre los resultados de éste y otros estudios pueden ser explicadas en parte por los tamaños de muestra de aislados utilizados en los mismos, como en el caso de Hermann *et al.* (1989); Stanis y Jones (1985) y Koller *et al.* (1991), cuyas CE_{50} provienen de la sensibilidad de 1; 12; y 300 aislados respectivamente, en comparación a los 50 utilizados en el presente estudio. Con respecto a lo anterior, Smith *et al.* (1991), señalan que un tamaño de muestra de 50 aislados monoconidiales resultó adecuado para este tipo de investigación, ya que un tamaño más grande de muestra tuvo un pequeño impacto en la precisión, mientras que esta se fue perdiendo rápidamente con tamaños de muestra más pequeños. Así mismo una línea base construida a partir de 500 muestras puede ser excelente pero no siempre necesaria, por el contrario tampoco se definiría adecuadamente con menos de 20, sin embargo es más probable que 50 muestras den una imagen razonable (Russell, 2003). Smith *et al.* (1991), sostienen que el uso de 50 aislados fue necesario para detectar variaciones de sensibilidad de 1,6 veces entre valores promedio de CE_{50} de al menos dos poblaciones silvestres. En efecto, si se compara la CE_{50} promedio obtenida en este estudio ($0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$) con la obtenida por Smith *et al.* (1991), de valor $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$, la proporción entre ambas es de 2,25 numéricamente semejante al 1,6 establecido, señalando que ambos valores CE_{50} se alojarían dentro de un rango de variación natural o común de sensibilidades correspondientes a poblaciones de *V. inaequalis*.

El (**fr**) de la población silvestre para fenarimol resultó de valor 15,5, y simplemente indica la ubicación del fenotipo con sensibilidad más baja alojado en la población. Smith *et al.* (1991), señalan que el uso recomendado para el término “resistencia” es para aislados del patógeno con sensibilidades significativamente menores que la población silvestre original. De acuerdo a la definición anterior el aislado con la menor sensibilidad de la población silvestre puede ser denominado como “resistente” (en este caso con una proporción 15 veces menos sensible que la población silvestre original) y por consiguiente frente a una presión de fungicida puede ser seleccionado y tener la capacidad de incrementar su frecuencia, con el siguiente cambio en la población. De lo anterior, se obtiene la idea de que el incremento y posterior riesgo de desplazamiento de una proporción de fenotipos resistentes, en un tiempo dado de presión más allá del nivel umbral de control satisfactorio de la enfermedad, dependerá directamente de las condiciones de uso del fungicida en la práctica, en relación a su utilización reiterativa.

La CD de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, sugerida en este estudio, discrepa de la concentración de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ propuesta por Koller *et al.* (1991) y Smith *et al.* (1991), para realizar monitoreos de sensibilidad en base a crecimiento relativo. Por otro lado Stanis y Jones (1985) sugirieron CDs para fenarimol ($1 - 1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) con el objeto principal de señalar un punto de corte entre fenotipos sensibles de resistentes. En relación a ambos criterios, Russell, (2003) sostiene que una concentración discriminatoria es una sola dosis de aplicación a la que, dependiendo de la reacción del aislado fungoso, es posible declarar a este como sensible o resistente, no obstante, es factible utilizarla para dividir ambas categorías (sensible y resistentes) en ulteriores sub-divisiones, y de esta forma hacer una descripción más detallada de la sensibilidad de grupos en una población.

La sensibilidad de los aislados de *V. inaequalis* de huertos comerciales a fenarimol presentó una distribución de frecuencias “lognormal” simple o unimodal lo cual difiere de lo observado por Braun y Mc Rae (1992), quienes señalan que la distribución de aislados de huerto expuestos a fungicidas IBE exhibió dos distribuciones normales dentro de la misma población (distribución bimodal). Sin embargo este comportamiento se atribuyó a la presencia de inoculo de árboles usados como testigos para estudios anteriores realizados en el huerto comercial.

El rango de sensibilidades de la población de huertos comerciales a este fungicida evidenció un factor de separación notoriamente menor que el obtenido para la población línea base, lo cual indicó una pérdida en la variabilidad de respuestas de la población reflejando un estrechamiento de la distribución de sensibilidades. En relación a lo anterior Koller *et al.* (1991), señalan para fungicidas IBE, que en una distribución de sensibilidades de rango estrecho existe una alta probabilidad de que la proporción de fenotipos resistentes a un tiempo dado de presión de selección, se desplace más allá de un nivel umbral de control satisfactorio de la enfermedad.

El (**FR**) de valor 5,8 concuerda con la información reportada previamente. Fiaccadori *et al.* (1987), relacionaron factores de 3; 1,8 y 4,8 para biternatol, fenarimol y penconazole, respectivamente, con un control insatisfactorio de la sarna. Hildebrand *et al.* (1989), correlacionaron fallas en el control de la enfermedad con un valor promedio entre factores 5 y 7. Smith *et al.* (1991), aseveran que cambios en los valores CE_{50} promedios representados por factores de resistencia de 3 a 4 serían índice suficiente para considerar disminución de la acción en campo de un fungicida IBE.

EPPO (1988), señala que el nivel de resistencia debe ser expresado como la proporción entre CE_{50} promedio resistente/ CE_{50} promedio silvestre (línea base). Cabe destacar, que esta definición del (**FR**) hace referencia a un valor que indica una proporción entre las sensibilidades de la población silvestre y la de huertos comerciales, y que a la vez dilucida variabilidad de estas en el tiempo, proceso comúnmente denominado como cambios cuantitativos hacia resistencia.

La estimación de la sensibilidad de los aislados, basada en el CR a la CD establecida previamente, permitió detectar evidentes variaciones en las frecuencias de aislados de la población de huerto con respecto a las presentes en la población línea base. El aumento, con una proporción de 18,9 veces por sobre las observadas en la línea base, se pronunció sustancialmente en el $CR \geq 80$. Este resultado discrepa de lo obtenido por Koller *et al.* (1997), quienes observaron un importante aumento de las frecuencias en el $CR \geq 90$ para el mismo activo. Este mayor valor puede deberse a que los aislados evaluados provenían de huertos con evidencia de resistencia práctica, en donde claramente el número de aislados menos sensibles se intuía importante, a diferencia de los aislados evaluados en el presente estudio que se obtuvieron de huertos comerciales expuestos a la acción de fungicidas sin evidencia previa de control insuficiente de la enfermedad. El aumento de 18,9 veces la frecuencia de aislados con $CR \geq 80$ y la presencia de grupos menos sensibles (CR cercano a 90) ausentes en la línea base, evidencian pérdida de sensibilidad de la población del patógeno al fungicida.

Pyrimethanil: Para este fungicida la población de aislados línea base presentó un rango de distribución de sensibilidad de amplitud media (>500) en comparación a los demás fungicidas evaluados en este estudio. En cambio Koller *et al.* (2005), al analizar el comportamiento de 22 aislados de *V. inaequalis* provenientes de la parte oeste de Nueva York (EE.UU) para el mismo activo, obtuvieron una distribución de rango muy estrecho (<50). La discrepancia entre estos resultados, puede en parte estar ligada al tamaño muestral utilizado en ambos ensayos. En relación a esto Koller *et al.* (1991), señalan que fenotipos con altos niveles de resistencia (baja sensibilidad) suelen existir en poblaciones basales, sin embargo no es frecuente identificarlas con un tamaño de muestra limitado. Por consiguiente la evaluación de un tamaño más apropiado de muestra permitiría identificar fenotipos más resistentes y asimismo la amplitud del rango de sensibilidades se incrementaría. No obstante, la sensibilidad media de la población ($0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue similar a la obtenida por dichos autores ($0,16 \mu\text{g mL}^{-1}$) y más aún la concentración

discriminatoria deducida fue la misma ($0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), indicando una significativa similitud en la respuesta de *V. inaequalis* al activo en ambas localidades.

La distribución de sensibilidad de los aislados de huertos comerciales presentó un rango medio de amplitud muy similar al presentado por la distribución de los aislados de la población silvestre, situación que evidenció una leve alteración en la variabilidad de la respuesta a pyrimethanil de fenotipos de *V. inaequalis* provenientes de huertos comerciales en relación a la población silvestre. Las sensibilidades medias de ambas poblaciones no presentaron diferencias significativas y evidenciaron un pequeño FR de 1,4. Koller *et al.* (2005), reportaron un factor de resistencia que reflejó una proporción 6 veces menor de sensibilidad a pyrimethanil en los aislados de huertos del Oeste de Nueva York en comparación a los de la línea base. Por otro lado Kung *et al.* (1999), reportaron en huertos europeos, con exposición prolongada a cyprodinil (otra anilino pirimidina), cambios de sensibilidad de aislados con un factor de resistencia >30 (una proporción de 30 veces menor sensibilidad con respecto a la línea base).

En relación a los reportes anteriores, cabe mencionar que en dichas investigaciones se analizó la situación de huertos comerciales específicos y que por lo tanto la población evaluada probablemente fue genéticamente más homogénea y por ende, la respuesta a la evaluación reflejó cambios cuantitativos de mayor magnitud.

Con respecto a un bajo factor de resistencia Koller *et al.* (2005), señalan que en el presente se especula sobre la existencia de genes que codifican para transportadores ABC responsables de la disminución intracelular de las concentraciones de diversos fungicidas, los cuales conferirían un bajo nivel de resistencia a pyrimethanil, sin embargo podría ocurrir que tengan así mismo un impacto en la acción de otras clases de fungicidas y con esto lentamente la población siga el curso de una resistencia cuantitativa (multigénica). Por consiguiente, ciertas dosis de pyrimethanil efectivas en una población sensible a otra clase de fungicida (IBE por ejemplo) podrían ser menos efectivas en una población en la cual tales genes que confirieren la resistencia multigénica han sido seleccionados a altas frecuencias, a pesar de que la población presenta un factor bajo de resistencia para pyrimethanil.

Por otro lado, la estimación de la sensibilidad de los aislados basada en el CR, a la CD ($0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) previamente determinada, permitió detectar leves variaciones en las frecuencias de los aislados en la población de huerto con respecto a las presentes en la población línea base. Asimismo se observó, una disminución de los aislados de mayor sensibilidad y un leve aumento en las frecuencias de CR =30 y 60, situación que ilustró un dinamismo inicial en el proceso de pérdida de sensibilidad de la población de aislados. De esta manera, es posible sostener que la sensibilidad de *V. inaequalis* proveniente de huertos comerciales, para este fungicida, presentó una tendencia a concentrarse y que desplazamientos de grupos de aislados de menor sensibilidad (no presentes en la línea base) no fueron evidentes.

La CD de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, sugerida en esta investigación para monitorear *in vitro* la disminución de sensibilidad de una población de *V. inaequalis* a pyrimethanil, concuerda con el valor propuesto por Koller *et al.* (2005), para realizar monitoreos de sensibilidad en base a crecimiento relativo.

Cabe destacar que los datos obtenidos para el propósito de este estudio solo evidencian la variación de la respuesta de aislados de distintas localidades, a diferencia de lo que evidenciaría la evaluación de muestras de un huerto comercial específico con un control insatisfactorio de la enfermedad en donde probablemente la situación sería más acentuada.

CONCLUSIONES

De acuerdo con las condiciones y metodologías utilizadas en el desarrollo de esta Memoria de Título, se puede concluir lo siguiente:

- Las líneas base de sensibilidad de *V. inaequalis*, a los fungicidas mancozeb, pyrimethanil, fenarimol y difenoconazole poseen una gran variabilidad de respuestas con una distribución de tendencia normal.
- La concentración discriminatoria obtenida en este estudio para el fungicida fenarimol no concuerda con la reportada en estudios extranjeros, no ocurriendo lo mismo con pyrimethanil, en donde existe una gran concordancia con lo reportado en otros estudios.
- Los aislados de *V. inaequalis*, provenientes de huertos comerciales, presentan una importante pérdida de sensibilidad a los activos mancozeb y fenarimol, en relación a la población silvestre.
- Los aislados de *V. inaequalis*, provenientes de huertos comerciales, presentan una no despreciable pérdida de sensibilidad al activo difenoconazole, en relación a la población silvestre.
- Los aislados de *V. inaequalis*, provenientes de huertos comerciales, no evidencian pérdida significativa de sensibilidad al activo pyrimethanil, en relación a la población línea base.
- La determinación de la sensibilidad basal a fungicidas en poblaciones chilenas de *V. inaequalis* no sometidas a agroquímicos constituye un importante aporte al conocimiento del comportamiento actual de éstos ya que permite evaluar el nivel de pérdida de sensibilidad en poblaciones de huertos comerciales, que se encuentran bajo constante aplicación de fungicidas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, N.G. 1991. Enfermedades de las plantas ocasionadas por hongos. pp.339-361. In: Fitopatología. Editorial Limusa. México. 838p.
- Alexopoulos, J.C., Mims, Ch., y Blackwell. 1985. Clase Ascomycetes. Pp.400-420. In: Introducción a la micología. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 638p.
- Alvarez, M., y Pinilla, B. 2002. Comportamiento de nuevos activos en el control de la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*), en sistema mixto, a calendario y a condiciones. Revista frutícola 23(3):97-100.
- Alvarez, M., Pinilla, B., y Herrera, G. 2004. Enfermedades del manzano. pp 45-50. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA CRI – La Platina. Santiago, Chile. 71p.
- Biggs, A.R. 1990. Apple scab, páginas 6-9. In: Compendium of apple and pear diseases. A.L. Jones and H.S Aldwinckle, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, Mn.
- Braun, P. G., and McRae, K. M. 1992. Composition of a population of *Venturia inaequalis* resistant to myclobutanil. Can. J. Plant Pathology 14: 215-220.
- EPPO. 1988. fungicide resistance : Definitions and use of terms. EPPO Bull. 18: 569-574.
- Fiaccadori, R., Gielink, A. J., and Dekker, J. 1987. Sensitivity to inhibitors of sterol biosynthesis in isolates of *Venturia inaequalis* from Italian and Dutch orchards. Neth. J. Plant Pathology 93: 285-287.
- Hermann, M., Szith, R., and Zinkernagel, V. 1989. Verringerte sensitivität einiger isolate von *Venturia inaequalis* aus der steiermark für EBI fungizide. Gartenbauwissenschaft 54:160-165. (Abstract)
- Hildebrand, P. D., Lockhart, C. L., Newbery, R. J., and Ross, R. G. 1989. Resistance of *Venturia inaequalis* to bitertanol and other demethylation-inhibiting fungicides. Can. J. Plant Pathology 10: 311-316.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. and Stalpers, J.A. 2008. Ainsworth and Bisby's. Dictionary of the fungi. Cab International UK. 771 p.
- Koenraadt, H., Somerville, S., and Jones, A.L. 1992. Characterization of mutations in the Beta – tubulin gene of benomyl – resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. Phytopathology 82:1348 – 1354.

- Koller, W., Parker, D.M, and Reynolds, K.L. 1991. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* to sterol demethylation inhibitors. *Plant Disease* 75:726 – 728.
- Koller, W., Wilcox, W.F., Barnard, J., and Jones, A. L., and Braun, P. G. 1997. Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* population to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology* 87:184-190.
- Koller, W., Wilcox, W. F., and Jones, A. L.1999. Quantification, persistence, and status of dodine resistance in New York and Michigan orchard populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* 83:66-70.
- Koller, W., Wilcox, W.F., and Parker, D.M. 2005. Sensitivity of *Venturia inaequalis* populations to anilinopyrimidine fungicides and their contribution to scab management in New York. *Plant Disease* 89: 357- 365.
- Küng, R., Chin, K. M., and Gisi, U. 1999. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to cyprodinil. Pp 313-322. *In: Modern fungicides and antifungal compounds II*. H. Lyr, P. E. Russel, H W. Dehne, and H. D. Sisler, eds. Intercept, Andover, UK.
- Kunz, S., Lutz B., Deising H., and Mendgen K. 1997a. Acquisition of resistance to sterol demethylation inhibitors by populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 87: 1272-1278.
- Kunz, S., Lutz B., Deising H., and Mendgen K. 1997b. Assesment of sensitivities to anilinopyrimidine and strobilurin fungicides in populations of the apple scab fungus *Venturia inaequalis*. *J. Phytopathology* 146: 231-238.
- Latorre, B. 2003. Enfermedades de las plantas cultivadas. 6° Ed.C.I.P Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 638 p.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., Gredt, M. 1999 Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Prot* 18:687-697.
- McHardy, W. 1996. Apple scab: biology, epidemiology and management. APS Press. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA. 545p.
- Neumann, G. L., Winter, E. H., and Pittis, J. E. 1992. Pyrimethanil: A new fungicide. Pp 395-402. *In: The BCPC Conference Pests and Disease, Conference Proceeding*, British Crop Protection Council. Farnham, Surrey, UK.
- Odepa, 2009. Estadísticas Agrícolas. Oficina de Estadísticas y Planificación. Gobierno de Chile, Santiago, Chile. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl>. Leído el 23 de Marzo de 2009.

Pinto de Torres, A., English, H., y Alvarez, M. 1994. Enfermedades de los frutales de hoja caduca en Chile. Pp 186-200. 2nded. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA. Santiago, Chile. 311p.

Rosenberger, D.A and Cox, K. D. 2010. Apple scab management options for high-inoculum orchards. New York fruit Quarterly Vol.18 (1):3-8.

Russel, P. E. 2003. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management: FRAC Monograph No 3. Crop Life International. Brussels, Belgium.56p.

Sallato, B y Latorre, B. 2006. First report of practical resistance to QoI fungicides in *Venturia inaequalis* (apple scab) in Chile. Plant Disease 90: 375.

Smith, F. D., Parker, D. M., and Koller, W. 1991. Sensitivity distribution of *Venturia inaequalis* to the sterol demethylation inhibitor flusilazole: Baseline sensitivity and implication for resistance monitoring. Phytopathology 81: 392-396.

Stanis, V.F and Jones, A.L. 1985. Reduced sensitivity to sterol inhibiting fungicide in field isolates of *Venturia inaequalis*. Phytopathology 75: 1098- 1101.

Swezey, S. L., Vossen, P., Caprile, J., Bentley, W. 2000. Organic Apple Production Manual. University of California, Division of Agriculture and Nature Resources. Oakland, California, USA.

Thind, T. S., Clerjeu, M., and Olivier, J. M. 1986. First observation on resistance in *Venturia inaequalis* and *Guignardia bidwellii* to ergosterol biosynthesis inhibitors in France. Pp 491-498. In: Proc. Br. Crop Prot. Conf 2nd.

Torres, A., y Andrade, O. 1996. Control químico de *Venturia inaequalis* a calendario fijo. Agricultura Técnica 56(4) : 255-263.

Torres, A., Barrientos, L., Gutiérrez, Ana., y Gidekel, M. 2002. Control biológico de venturia o sarna del manzano. Revista Tierra Adentro 45 (julio-agosto): 16-19.

Tremblay, D. M., Talbot, B. G., and Carisse, O. 2003. Sensitivity of *Botrytis squamosa* to Different Classes of Fungicides. Plant disease. Vol 87 (5) May: 573- 578.

Uesugi, Y. 2002. Fungicides, Multisite inhibitors-Broad spectrum surface protectants, páginas 592-596. In: J.R. Plimmer, Encyclopedia of agrochemicals, Volume 2.