



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMIA**

**Pérdida de sensibilidad a los fungicidas difenoconazole (DMI) y pirimetanil  
(anilinopirimidina) en aislados de *Venturia inaequalis* y su resistencia al fungicida  
trifloxiestrobil (grupo de QoI) en la Región del Maule, Chile**

**MEMORIA DE TITULO**

**MARÍA PAULINA AVILA JIMÉNEZ**

**TALCA-CHILE,  
2019**



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Pérdida de sensibilidad a los fungicidas difenoconazole (DMI) y pirimetanil  
(anilinopirimidina) en aislados de *Venturia inaequalis* y su resistencia al fungicida  
trifloxiestrobil (grupo de QoI) en la Región del Maule, Chile**

**Por**

**MARIA PAULINA AVILA JIMENEZ**

**MEMORIA DE TITULO**

**Presentada a la  
Universidad de Talca como  
parte de los requisitos para optar al título de**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TALCA- 2019**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



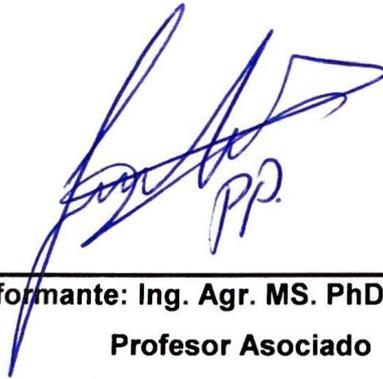
Talca, 2019

**Aprobación:**



---

**Profesor Guía: Ing. Agr. Mg. Cs. Dr. Gonzalo A. Díaz**  
**Profesor Asistente**  
**Escuela de Agronomía**  
**Facultad de Ciencias Agrarias**



---

**Profesor informante: Ing. Agr. MS. PhD. Mauricio Lolás C.**  
**Profesor Asociado**  
**Escuela de Agronomía**  
**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Fecha de presentación de Memoria de Título 14 de mayo del 2019**

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco especialmente a mi mamá Anita, a mis hermanas Karla, María Jesús y María José y a mi pequeña hija Rosario, por el gran apoyo, fortaleza, entendimiento y preocupación a lo largo de toda esta carrera.*

*A mis amigas Jessica, Carolina, Belén y Carmen Gloria por el ánimo y apoyo en todas mis dificultades.*

*Agradezco al padre de mi hija, Matías, por el apoyo y preocupación en los momentos más complicados de este período.*

*Agradezco al profesor Gonzalo Díaz y Claudia Pacheco por la gran ayuda y dedicación en esta memoria, como al laboratorio de Patología Frutal por proporcionar todo lo necesario para realizar el presente estudio, también a la profesora Gabriela Cofré por su preocupación, afecto y apoyo en la última etapa de esta tesis.*

*Y finalmente agradezco a todas las personas que conozco y conocí en esta linda etapa, las cuales con un poquito de ayuda hicieron posible mi camino hasta aquí.*

## RESUMEN

La principal enfermedad fungosa que afecta al manzano es la sarna del manzano causado por *Venturia inaequalis*. La sarna del manzano se controla principalmente con el uso de fungicidas, desde inicio de puntas verdes hasta la madurez del fruto. No obstante, desde hace años, la aplicación de algunos fungicidas no está dando resultados muy efectivos en el control, tal vez por pérdida de sensibilidad a los fungicidas por aplicaciones continuas de estos en el tiempo. Por lo tanto, en el presente trabajo se colectaron 22 aislados de *V. inaequalis* obtenidos de lesiones sarnosas de hojas desde huertos comerciales de la Región del Maule y de la Región de la Araucanía, a los cuales se les determinó CE50 de los fungicidas difenoconazole (DMI), pirimetanil (anilino pirimidina) y trifloxiestrobil (QoI). Los resultados obtenidos indicaron que cinco aislados (22,7%) de *V. inaequalis* superan la dosis discriminadora de CE50 de 0,04 µg/ml y 0,2 µg/ml propuestos para pérdida de sensibilidad a los fungicidas difenoconazole y pirimetanil, respectivamente. En el caso del ingrediente activo trifloxiestrobil, once aislados (50%) de *V. inaequalis* presentaron crecimiento sobre 2,0 µg/ml, lo que demostraría pérdida de sensibilidad *in vitro* ante este fungicida con factor de resistencia sobre 100. A los once aislados se les detectó la mutación del sitio G143A del gen Cyt b, otorgando una alta resistencia genética a los fungicidas QoI.

## ABSTRACT

The major fungal disease affecting the apple trees is apple scab caused by *Venturia inaequalis*. Apple scab is controlled mainly with the use of fungicides, applied from the beginning of green tips to the harvest of the apple tree. However, for many years, the application of some fungicides is not giving very effective results in the control, perhaps due to loss of sensitivity to fungicides by continuous applications of fungicides in the seasons. Therefore, in the present study, 22 isolates of *V. inaequalis* obtained from leaves with apple scab were collected from commercial orchards of the Maule Region and the Araucanía Region. These 22 isolates were analyzed *in vitro* and EC50 to difenoconazole (DMI), pyrimethanil (anilinopyrimidine) and trifloxystrobin (QoI) fungicides, was determined. The results obtained indicated that five isolates of *V. inaequalis* (22.7%) exceed the discriminatory dose of EC50 of 0.04 µg/ml and 0.2 µg/ml proposed for loss of sensitivity to the fungicides difenoconazole and pyrimethanil, respectively. In the case of trifloxystrobin, eleven isolates of *V. inaequalis* (50%) obtained EC50 above 2.0 µg/ml, showing a loss of sensitivity *in vitro* with a resistance factor over 100. In the eleven isolates of *V. inaequalis*, the mutation of the G143A site of the Cyt b gene, was detected, providing a high genetic resistance to the QoI fungicides.

## INDICE

	Página (no.)
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Hipótesis	2
1.2. Objetivo general	2
1.3. Objetivos específicos	3
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b>	<b>4</b>
2.1. El cultivo del manzano	4
2.1.1. Superficie y producción mundial de manzanas	4
2.2. Enfermedades en el manzano	5
2.2.1. Principales enfermedades del manzano en Chile	5
2.3. <i>Venturia</i> , sarna, roña, moteado ( <i>Venturia inaequalis</i> )	5
2.4. Control químico de sarna del manzano	7
2.4.1. Pirimetanil	8
2.4.2. Difenoconazole	8
2.4.3. Trifloxiestrobín	8
2.5. Resistencia de <i>Venturia inaequalis</i> a fungicidas	9
2.6. Detección molecular a través de la técnica PCR	10
2.6.1. Elementos utilizados en PCR	10
2.6.2 Detección del gen citocromo b (Cyt b) asociado a la resistencia a Qol	12
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1. Aislados fúngicos	13
3.2. Fungicidas	15
3.3. Determinación <i>in vitro</i> del CE50 de los aislados de <i>Venturia inaequalis</i>	15
3.4. Determinación molecular de la resistencia a trifloxiestrobín	16

3.5. Diseño de experimento	17
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>18</b>
4.1. Prueba <i>in vitro</i>	18
4.2. Detección molecular de la mutación G143A del gen Cyt b	21
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
<b>VI. CONCLUSION</b>	<b>26</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>27</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 3.1.** Origen de los aislados de *Venturia inaequalis* colectados desde la Región del Maule hasta la Región de la Araucanía utilizados en el presente estudio. ....14

**Cuadro 3.2.** Partidores específicos para la detección de la mutación del sitio G143A del gen citocromo b (Cyt b) en aislados de *Venturia inaequalis* para determinar resistencia a trifloxiestrobín. ....17

**Cuadro 4.1.** Valores de concentración efectiva del 50% (CE50, µg/ml) del crecimiento micelial a los ingredientes activos difenoconazole, pirimetanil y trifloxiestrobín, y reacción a la enzima de restricción (enzima Fnu4HI) asociada a la presencia de la mutación G143A (confiere resistencia a fungicidas inhibidores de la Quinona, QoI) en el gen Cyt b en 22 aislados de *Venturia inaequalis* obtenidos en la Región del Maule y Región de la Araucanía. ....19

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Ciclo biológico de la sarna del manzano causada por <i>Venturia inaequalis</i> (Agrios, 2007). .....	<b>6</b>
<b>Figura 2.2.</b> Síntomas de sarna del manzano en hojas y frutos. <b>A</b> , lesiones sarnosas en hojas cv. Royal Gala. <b>B</b> , lesión sarnosa en fruto cv. Fuji. ....	<b>7</b>
<b>Figura 2.3.</b> Pasos de un ciclo de la PCR. Desnaturalización, hibridación y extensión (Temay de Dios <i>et al.</i> , 2013). .....	<b>12</b>
<b>Figura 3.1.</b> Crecimiento micelial de aislados de <i>Venturia inaequalis</i> en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD) después de 30 días de incubación a 12°C. <b>A</b> , aislado 1. <b>B</b> , aislado 18. <b>C</b> , aislado 19. <b>D</b> , aislado 5. ....	<b>13</b>
<b>Figura 3.2.</b> Procedimiento determinación <i>in vitro</i> del CE50 de los aislados de <i>Venturia inaequalis</i> . <b>A</b> , Siembra de trozo invertido de agar de 3 mm de diámetro de aislado de <i>V. inaequalis</i> de 30 días de edad, sobre placa de Petri con fungicida difenoconazole. <b>B</b> , Cámara de crecimiento en donde se incuban los aislados de <i>V. inaequalis</i> a 17 °C. ....	<b>16</b>
<b>Figura 4.1.</b> Alineamiento parcial de secuencias de consenso de aislados de <i>Venturia inaequalis</i> del gen citocromo b, que muestra el cambio de la posición 143 de guanina por citosina, produciendo un cambio de aminoácido de glicina a alanina, confiriendo una resistencia a fungicidas inhibidores de la quinona (QoI, respiración celular) como trifloxiestrobil. Aislado de referencia AF004559 de <i>V. inaequalis</i> sin mutación genética disponible en GenBank. ....	<b>21</b>
<b>Figura 4.2.</b> Gel de agarosa de la reacción de la digestión con la enzima de restricción Fnu4HI del producto PCR generado con los partidores PS1/PR1 en aislados de <i>Venturia inaequalis</i> obtenidos en la Región del Maule y Región de la Araucanía. Los aislados sensibles (S) presentan un fragmento no cortado (500 pb) y aislados resistentes (R) en fragmento cortado (400 pb). ....	<b>22</b>

## I. INTRODUCCIÓN

La manzana es una fruta pomácea comestible obtenida del manzano doméstico (*Malus x domestica* Borkh). Se considera una de las especies frutales de mayor producción e importancia a nivel mundial, ya que, a lo largo de la historia, se le ha atribuido virtudes nutricionales, pues es rica en agua, carbohidratos y flavonoides (Pacheco, 2009).

En Chile, su producción abarca una gran cantidad de especies cultivadas, siendo después de la vid de mesa, los nogales y los paltos, el frutal más plantado alcanzando una superficie de 35.652 ha (Muñoz, 2018) entre manzanas rojas y verdes (11,4% del total de frutales al 2017) (ODEPA, 2018). La Región del Maule es la que presenta mayor superficie comercial plantada de manzanos (22.730 ha), con alrededor del 63% de la superficie nacional (Muñoz, 2018). Las exportaciones durante la temporada 2018 fueron de 716.924 ton, siendo actualmente los principales destinos de la manzana chilena fresca los mercados de Europa, Sudamérica y Asia, aumentando así el volumen exportado en comparación con el año 2017 (Muñoz, 2018).

Sin embargo, estas exportaciones son afectadas por diversos factores o problemas de pre o postcosecha. Dentro de las enfermedades que causan pérdidas del rendimiento y de frutos, y que es de control obligado cada temporada en los huertos comerciales de manzanos, se encuentra la sarna del manzano, causada por el hongo fitopatógeno *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter (Latorre, 2004; Lolas y Díaz, 2016). La sarna del manzano, es una de las principales enfermedades de este frutal, especialmente cuando este se sitúa en climas fríos y húmedos, o se ve afectada por una inestabilidad climática donde se dan lluvias, días nublados y alta humedad relativa durante primavera y verano (Lolas y Díaz, 2016). Es considerada la enfermedad más importante económicamente que afecta a los manzanos a nivel mundial (Sutton *et al.*, 2014).

El hongo ascomicete *V. inaequalis* puede infectar hojas, brotes, flores y frutos, siendo los síntomas más observados las infecciones de hojas y frutos (Sutton *et al.*, 2014). Los primeros síntomas aparecen temprano en la temporada como pequeñas manchas, más notorias en la parte inferior de las hojas nuevas, ya que esta parte es la primera expuesta cuando emerge la hoja en primavera, aproximadamente en septiembre. Las manchas nuevas son de color castaño a verde oliva con un margen indefinido, y a veces el tejido bajo las manchas se levanta deformando las hojas afectadas. Posteriormente la lesión crece, tomando un color café con un aspecto sarnoso (Acuña, 1991; Latorre, 2004; Sutton *et al.*, 2014).

Epidemiológicamente, este patógeno sobrevive durante el invierno en estructuras denominadas pseudotecios en las hojas que están en el suelo (fuente de inóculo primario),

diseminando las ascosporas en inicio de puntas verdes en presencia de agua libre y viento, ocasionando la infección primaria (Latorre, 2004; Sutton *et al.*, 2014). Posteriormente, se pueden repetir ciclos de infección durante primavera y verano, desde las infecciones primarias en hojas por liberación de conidias en presencia de agua libre que ocurran en el huerto (Latorre, 2004).

Una de las soluciones es la utilización de fungicidas de contacto y sitio específicos que se aplican solos o en combinación durante casi todo el período de crecimiento de brotes y frutos para prevenir la infección por *V. inaequalis* (Lolas y Díaz, 2016). El control químico es actualmente la única estrategia eficaz para el manejo de la sarna del manzano en cultivares susceptibles, como por ejemplo en huertos comerciales del este y medio oeste de Estados Unidos donde se requieren de hasta 12 aplicaciones de fungicidas por temporada para asegurar un control adecuado de la enfermedad (Lesniak *et al.*, 2011).

Actualmente se disponen solo dos trabajos a nivel nacional que han estudiado la sensibilidad de *V. inaequalis*, en donde se ha determinado la presencia de aislados resistentes al fungicida kresoxim-metil (grupo de inhibidores de la quinona, QoI) y presencia de aislados sensibles a difenoconazole (grupo de inhibidores de desmetilación, DMI), fenarimol (grupo de inhibidores desmetilación, DMI), mancozeb (grupo ditiocarbamatos) y pirimetanil (grupo de anilino pirimidinas, AP) (Sallato *et al.*, 2006; Henríquez *et al.*, 2011; FRAC, 2019). Sin embargo, en varias localidades de la Región del Maule se han reportado fallas de los programas de control de sarna del manzano, lo que se podría dar eventualmente por una mala aplicación de estos fungicidas (cobertura, penetración), errónea elección, o tal vez resistencia de este patógeno ante la acción del ingrediente activo sobre él. Por lo tanto, a continuación, se plantea la hipótesis y objetivos del presente estudio.

### 1.1. Hipótesis.

En la actualidad en Chile, aislados de *Venturia inaequalis* tendrían pérdida de sensibilidad a los fungicidas difenoconazole, pirimetanil y resistencia a trifloxiestrobil.

### 1.2. Objetivo general.

Evaluar la sensibilidad *in vitro* de diferentes aislados de *Venturia inaequalis* obtenidos desde huertos comerciales de manzanos, a los fungicidas difenoconazole, pirimetanil y trifloxiestrobil.

### 1.3. Objetivos específicos:

- Determinar CE50 de aislados de *Venturia inaequalis* a los fungicidas difenoconazole, pirimetanil y trifloxiestrobil.
- Detección molecular de la mutación G143A del gen Cyt b en aislados de *Venturia inaequalis* con pérdida de sensibilidad al fungicida trifloxiestrobil.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1. El cultivo del manzano

El manzano (*Malus x domestica* Borkh), es una planta caducifolia que se cultiva en zonas con inviernos fríos, siendo considerada una de las especies dulces más cultivadas y apetecidas a nivel mundial. Pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia Maloideae y género *Malus*. El árbol alcanza una altura máxima de 10 m, de tronco derecho y corteza lisa, sus hojas son de forma oval con bordes aserrados y sus flores son grandes hermafroditas de color rosa pálido y blanco dependiendo de la variedad. La manzana es un fruto carnoso (pomo) y tanto su forma, color y sabor, difieren dependiendo de la variedad (Choque y Chavarría, 2014).

#### 2.1.1. Superficie y producción mundial de manzanas

Si bien, según ODEPA (2013) la superficie mundial plantada de manzanos se ha mantenido estable, su producción mundial ha ido en alza las últimas temporadas, pasando de 71,5 millones de toneladas a 77 millones de toneladas del año 2013 a 2017 (Echenique, 2017), presentándose una baja al año 2018 llegando a 76,2 millones de toneladas producto de heladas y granizos en países como Estados Unidos, Rusia y Turquía (Agrimundo, 2018).

En cuanto a producción, China es el principal país representando el 56% del mundo, mientras que productores como Europa y Estados Unidos el 16% y 6% de la producción, respectivamente. Chile, en tanto, es el principal productor de manzanas del hemisferio sur con 29%, seguido por Brasil con 22%, Sudáfrica con 19%, Nueva Zelanda con 12% y Argentina con el 11%. Chile es el cuarto exportador de manzanas en el mundo, con el 12%, lo que junto con la Unión Europea, China y Estados Unidos conforma el 70% de la oferta exportadora y el principal del hemisferio sur con el 44% de las exportaciones (Echenique, 2017).

En la actualidad el manzano es el cuarto frutal más plantado después de las vides, alcanzando 35.652 hectáreas en Chile (Muñoz, 2018). Las principales zonas productoras se localizan en la zona central, entre las regiones de O'Higgins y del Maule, con un 20,7% y 63,8% de la superficie nacional, respectivamente. En cuanto a la importancia de los cultivares, el cv. Royal Gala acaparó el 48,3% de las ventas, seguida por los cvs. Granny Smith (11%), Pink Lady (10,7%), Fuji (9,9%) y Ambrosia (0,5%) entre otras.

## 2.2. Enfermedades en el manzano

Para que las plantas se enfermen es necesario que se cumplan los factores asociados con el triángulo de enfermedades. Estos son: 1) La presencia de un hospedero susceptible. 2) Presencia de un agente causal virulento y 3) Condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la infección. Los cuales deben ocurrir en conjunto y sin falta de alguno de ellos para que se presente la enfermedad.

Los agentes causales infecciosos son patógenos, transmisibles entre plantas sanas y enfermas y de origen biótico. Estos pueden ser hongos, bacterias, virus, viroides, fitoplasmas, nemátodos, plantas parásitas, protozoos y algunas algas con capacidad parasitaria al establecer relación con la planta hospedera (Latorre, 2004).

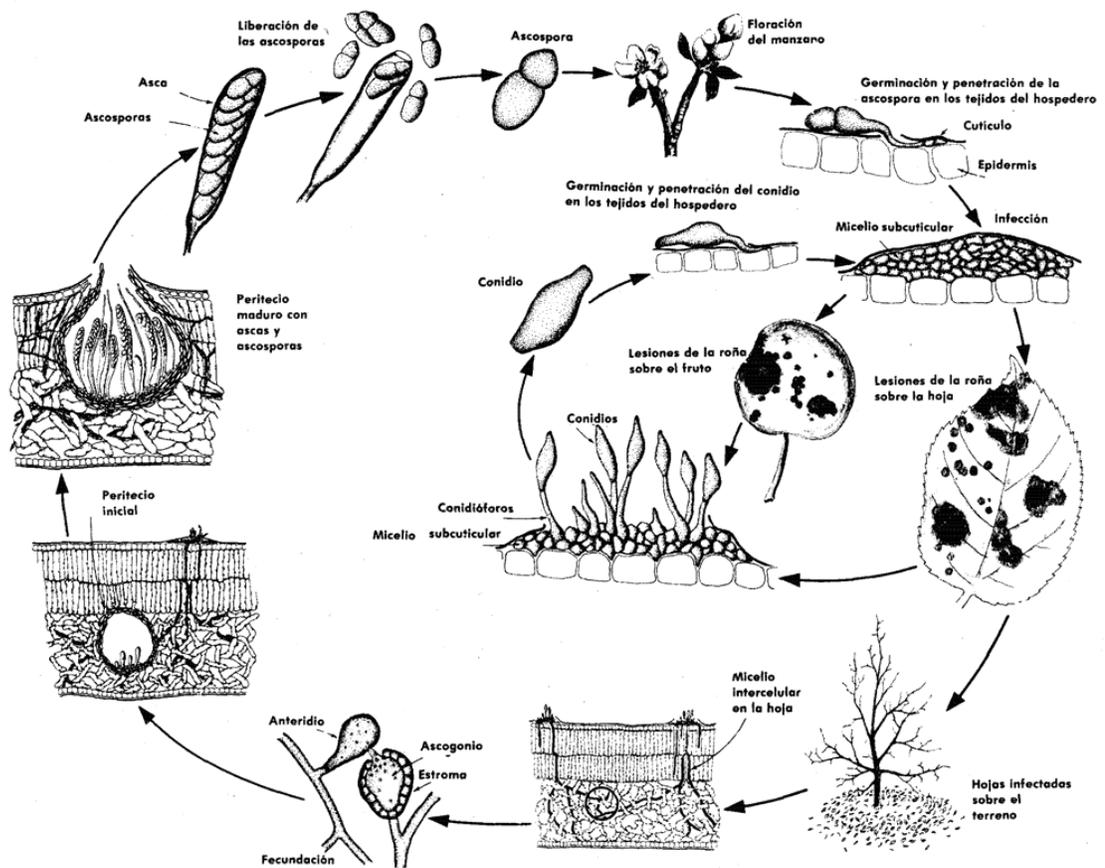
### 2.2.1. Principales enfermedades del manzano en Chile

En Chile el cultivo del manzano es afectado por varios problemas fitopatológicos, los cuales disminuyen su productividad y longevidad, además de afectar a la fruta (manzana) durante su maduración (precosecha y cosecha), almacenamiento y transporte (postcosecha). Entre las enfermedades que más afectan al manzano se destacan las causadas por hongos, es decir, micosis, siendo las más habituales y problemáticas: Sarna del manzano causada por *Venturia inaequalis*, Cancro europeo del manzano causado por *Neonectria ditissima*, Cancro áspero o muerte regresiva de brazos causado por *Botryosphaeria dothidae*, Pudrición calicinal de los frutos causada por *Botrytis cinerea* y el Plateado de las hojas causado por *Chondrostereum purpureum* que produce en el follaje una coloración gris metálico (Latorre, 2004).

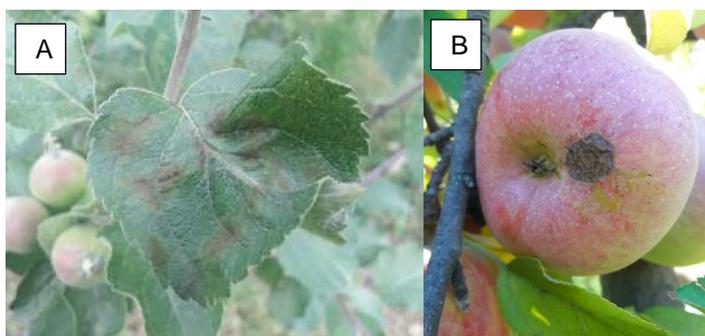
### 2.3. Venturia, sarna, roña, moteado (*Venturia inaequalis*)

Sin lugar a duda, la principal enfermedad a nivel nacional es la sarna del manzano. Los síntomas son pequeñas manchas sarnosas, frecuentemente esféricas y aterciopeladas de color verde oliva, la que se desarrolla en hojas, sépalos, pedicelos y frutos. En estos últimos detienen el crecimiento, se deforman y luego caen. La enfermedad aparece en el envés de las hojas y después cubre la lámina foliar, pudiendo provocar la defoliación anticipada de ella. Las infecciones ocurridas durante la cosecha producen en los frutos pequeñas pecas mohosas negras y superficiales, las que aparecen luego de varias semanas de almacenaje en frío. Su aparición se favorece con temperaturas templadas y abundantes lluvias en primavera (Latorre, 2004).

Epidemiológicamente, *V. inaequalis* sobrevive durante invierno en estructuras denominadas pseudotecios sobre las hojas que están en el suelo en descomposición (fuente de inóculo primario), diseminando las ascosporas en inicio de puntas verdes en presencia de agua libre (liberación de esporas) y viento, ocasionando la infección primaria en el árbol (Latorre, 2004; Sutton *et al.*, 2014). Esta liberación puede prolongarse de 3 a 5 semanas después de que ha ocurrido la caída de los pétalos. Las ascosporas germinan y producen infección sólo cuando se encuentra agua libre en un determinado período y temperatura (28 horas a 6°C, 14 horas a 10°C, 9 horas de 18 a 24°C y durante 12 horas a 26°C) (Agrios, 2007). Posteriormente, se pueden repetir ciclos de infección durante primavera y verano, desde las infecciones primarias en hojas por liberación de conidias en presencia de agua libre que ocurran en el huerto hasta la cosecha de los frutos (Figura 2.1) (Agrios, 2007; Latorre, 2004).



**Figura 2.1.** Ciclo biológico de la sarna del manzano causada por *Venturia inaequalis* (Agrios, 2007).



**Figura 2.2.** Síntomas de sarna del manzano en hojas y frutos. **A**, lesiones sarnosas en hojas cv. Royal Gala. **B**, lesión sarnosa en fruto cv. Fuji.

#### 2.4. Control químico de sarna del manzano

Es importante destacar que el uso de los fungicidas químicos sintéticos para el control de la sarna del manzano, debe ser acompañado de manejos culturales enfocados a disminuir las fuentes de inóculo y que favorezcan la penetración y exposición de brotes y frutos durante la aspersión de los productos.

Es ideal emplear cultivares menos susceptibles o resistente a la infección de *V. inaequalis* tales como Priscilla, Prima, Liberty, Jonafree y Redfree (Latorre, 2004; Sutton *et al.*, 2014), siendo estas variedades utilizadas por esta característica en huertos con producción orgánica. Entre los manejos culturales, está la aplicación de urea al 2-3% como tratamiento otoñal aplicada durante la caída de hojas para reducir el potencial del inóculo primario en el huerto (Sutton *et al.*, 2014).

Las primeras aplicaciones de fungicidas se realizan desde el estado de puntas verdes y mientras se mantengan condiciones ambientales favorables pudiendo ser: a) aplicaciones preventivas, según un calendario fijo relacionando el desarrollo fenológico del frutal o b) aplicaciones curativas, es decir, después de ciertas horas o días de ocurrida una lluvia, utilizando fungicidas con un alto poder retroactivo o post-infección (erradicante) (Latorre, 2004).

En Chile, los fungicidas permitidos para el control de sarna del manzano incluyen los grupos de fungicidas como Phtalamidas (ingrediente activo captan, fungicida multisitio), Ditiocarbamatos (i. a. mancozeb, fungicida multisitio) Anilino pirimidinas (i. a. pirimetanil y ciprodinil, sitio específico), Guanadina (i. a. dodine, fungicida multisitio), Inhibidores de la quinona (QoI, i. a. trifloxiestrobil y kresoxim-metil, sitio específico), inhibidores de demetilesterasa (DMI, i. a. difenoconazole, miclobutanil, fenarimol y tebuconazole, sitio específico) e Inhibidores de la

succinato deshidrogenasa (carboxamida, SDHI, i. a. isopirazam, fluopiran, y pentiopirad, sitio específico) entre otros (Latorre, 2004).

#### 2.4.1. Pirimetanil

El ingrediente activo pirimetanil de nombre químico 2-anilino-4,6-dimetilpirimidina, pertenece al grupo químico de las anilino pirimidinas (FRAC, 2019) Su modo de acción es inhibir la formación de aminoácidos (metionina), impidiendo la secreción de enzimas de los hongos y bloquea la asimilación de nutrientes, deteniendo el tubo germinativo y el crecimiento celular (FRAC, 2019). En Chile, el nombre comercial que utiliza este fungicida es Scala® 400 SC, proveniente de la empresa Bayer CropScience. Su modo de acción es de contacto y normalmente no ofrece peligro de toxicidad y respeta la fauna benéfica (Bayer, 2013). Se recomienda una dosis de 50 a 70 cc de producto comercial / 100 L de agua. No más de dos aplicaciones durante la temporada. Puede ser utilizado como fungicida de control preventivo o curativo (erradicante) de la sarna.

#### 2.4.2. Difenconazole

El ingrediente activo difenconazole, de nombre químico 3-cloro-4-[(2RS,4RS;2RS,4SR)-4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil-4-clorofenil éter, pertenece al grupo de inhibidores de la demetilesterasa (DMI), inhibiendo la biosíntesis de ergosterol (también denominados IBEs) de la membrana plasmática de los hongos. En Chile, un ejemplo de nombre comerciales es SCORE ® 250 EC y su proveedor es la empresa Syngenta S.A. Sin embargo, hay varios productos comerciales disponibles en Chile con ingrediente activo difenocoazole. Este es un fungicida sistémico recomendado para el control de *Venturia*, Oídio y otras enfermedades en pomáceas, teniendo un efecto de control preventivo y persistente, y por su acción retroactiva, permite su aplicación hasta 100 horas después de iniciado un período de condiciones para el desarrollo de esta enfermedad (Syngenta, 2017). Para el control de *Venturia* se recomienda una dosis de 10 a 15 cc/100 L de agua con un mínimo 200 cc/ha.

#### 2.4.3. Trifloxiestrobil

El ingrediente activo trifloxiestrobil, de nombre químico (E,E)- metoxiimino -(2-(1-(3-trifluorometil - fenil)-etilideneaminoximetil) -fenil)- ácido acético metil éster, pertenece al grupo químico de inhibidores de la quinona externa (QoI). Inhibe la cadena transportadora de electrones, de la respiración celular (FRAC, 2019). Nacionalmente la empresa Bayer CropScience, comercializa este i.a con el nombre comercial de Flint® 50% WG, y como Mystic 520 SC (donde incluye la mezcla de trifloxiestrobil y pirimetanil). Es un fungicida con modo de

acción mesostémico (fuerte adsorción y penetración a ceras de cutículas en hojas y frutos más una distribución superficial vía gaseosa en tejidos tratados). Normalmente no ofrece peligros de toxicidad. Entre otros, recomendado para el control de *Venturia*, *Alternaria* y *Oídio* en manzanos. Se recomienda una dosis de 7,5 a 10 g/100 L de agua para el control de *V. inaequalis* (Bayer, 2014).

## 2.5. Resistencia de *Venturia inaequalis* a fungicidas

La resistencia a fungicidas en *V. inaequalis* ha sido estudiado y extensamente publicado en fungicidas antiguos como dodine (Koller *et al.*, 1999), y tiofanato metil (grupo de bencimidazoles) (Jones y Walker, 1976). Aislados de *V. inaequalis* (n= 195 aislados) obtenidos en huertos comerciales de Michigan e Indiana (E.E.U.U), presentaron una alta proporción de los aislados resistentes a los fungicidas miclobutanil (grupo de DMI) y tiofanato metil (grupo de los bencimidazoles), donde valores del 57% y 93% de la población fueron resistentes respectivamente (Chapman *et al.*, 2011). Sin embargo, también se detectó aislados resistentes a dodine (grupo de las guanadinas) y kresoxim-metil (grupo Qol), pero en bajos niveles de la población. En otro trabajo en E.E.U.U, se analizaron más de 3.000 aislados de *V. inaequalis* desde el 2004 al 2013, en donde determinaron que existe una resistencia importante al fungicida miclobutanil, pero no al fungicida del mismo grupo (DMI) como difenoconazole (Villani *et al.*, 2015)

Por ejemplo, en Uruguay, se comprobó la resistencia de *V. inaequalis* a trifloxiestrobin y difenoconazole. Se analizó la resistencia a trifloxiestrobin en poblaciones de *V. inaequalis* provenientes de 10 huertos de manzana de diferentes zonas y con diferentes historiales de uso de estrobilurinas (Qol), donde los resultados muestran que la resistencia se encuentra generalizada en toda la zona de producción de manzanas. Los porcentajes de esporas resistentes fueron extremadamente altos, llegando al 95 % en un huerto comercial en el que se habían realizado más de 12 aplicaciones en la misma temporada (Mondino *et al.*, 2014).

En Chile se dispone de un solo trabajo que describe y estudia la resistencia de *V. inaequalis* al fungicida kresoxim-metil (Sallato *et al.*, 2006). En este trabajo, se detectó la presencia de aislados (n= 10) de *V. inaequalis* resistentes a kresoxim-metil *in vitro* al presentar germinación entre un 42% y 100% a la concentración discriminatoria (> 0,1 µg/mL) propuesta para determinar aislados resistentes a kresoxim-metil de manera *in vitro*. Los aislados de *V. inaequalis* resistentes se obtuvieron desde huertos comerciales con aplicaciones por 5 a 6 años consecutivos de utilizar el fungicida kresoxim-metil, en especial de aquellos huertos de manzanos con alta presión de la sarna del manzano (Sallato *et al.*, 2006). Sin embargo, la resistencia no fue confirmada a nivel

molecular al intentar detectar la mutación G143A del gen Cyt b asociada a la resistencia del grupo de QoI (kresoxim-metil).

En el trabajo de Henríquez *et al.* (2011), quienes determinaron la sensibilidad de 100 aislados, obtuvieron que todos los aislados de *V. inaequalis* fueron sensibles a los fungicidas pirimetanil, mancozeb, difenoconazole y fenarimol. Sin embargo, informalmente productores comerciales de manzanas se quejan de la falta de control de la sarna del manzano en sus respectivos huertos.

Si bien, kresoxim-metil es un fungicida que está disponible, este se ha dejado de usar en forma masiva asociado a los problemas de resistencia. Actualmente se dispone de otro fungicida perteneciente al mismo grupo (QoI) como el trifloxiestrobil para controlar la sarna del manzano, siendo un fungicida muy eficaz para el control de *V. inaequalis*. Pero para el caso de *V. inaequalis* se ha reportado la resistencia cruzada a los fungicidas pertenecientes al grupo de los inhibidores de la quinona (QoI) (FRAC, 2019).

## 2.6. Detección molecular a través de la técnica PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o 'Polymerase Chain Reaction' (PCR), es un método tecnológico que se utiliza para el estudio de los ácidos nucleicos, lo que es de gran ayuda para los estudios genéticos y de biología molecular, ya que es una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia que genera resultados en poco tiempo.

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, en los que la secuencia "blanco" es puntualmente copiada. Para esto, la reacción aprovecha la actividad de la enzima Taq ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### 2.6.1. Elementos utilizados en PCR

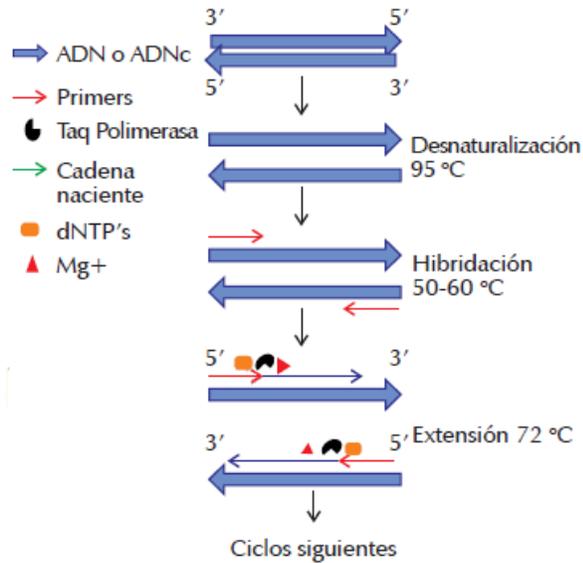
El elemento principal en la PCR es el ADN que lleva el nombre de templado, el cual son cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Al mismo tiempo, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. Otro elemento importante es la enzima, siendo la Taq ADN polimerasa la utilizada con más frecuencia, la cual proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, quien vive en condiciones de temperatura muy altos, y es por esta razón, que esta

enzima presenta la capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas (enzima termoestable). Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de elementos como partidores ('primers'), dNTPs, Mg<sup>+</sup>, buffer y H<sub>2</sub>O (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Los partidores son secuencia de oligonucleótidos que se sitúan a los lados y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a esta. Existen dos secuencias diferentes de partidores que se utilizan en PCR, una llamada "forward" o sentido y otra "reward" o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3'. Los dNTPs o desoxirribonucleicos trifosfatados son bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina y guanina), con las que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, es por esta razón que se debe utilizar una cantidad adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa. El buffer, es la solución amortiguadora en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8). Y finalmente el agua es el disolvente en la reacción usada en forma destilada libre de nucleasas (enzimas que degradan los ácidos nucleicos). Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales (Tamay de Dios *et al.*, 2013) (Figura 2.3) de las que se compone la PCR, las cuales son:

- Desnaturalización: etapa en la que las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos.
- Hibridación: en esta etapa los primers se alinean en el extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers es necesaria que la temperatura de hibridación sea la óptima (50-60 °C).
- Extensión: en esta última etapa la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y comienza su función catalítica a una velocidad muy alta y agrega dNTPs complementarios para crear cadenas completas en dirección de la síntesis del ADN (5'-3'). La temperatura óptima para esta reacción es de 72 °C.

Finalmente, para saber si la reacción de la PCR se llevó a cabo eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa, tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV.



**Figura 2.3.** Pasos de un ciclo de la PCR. Desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

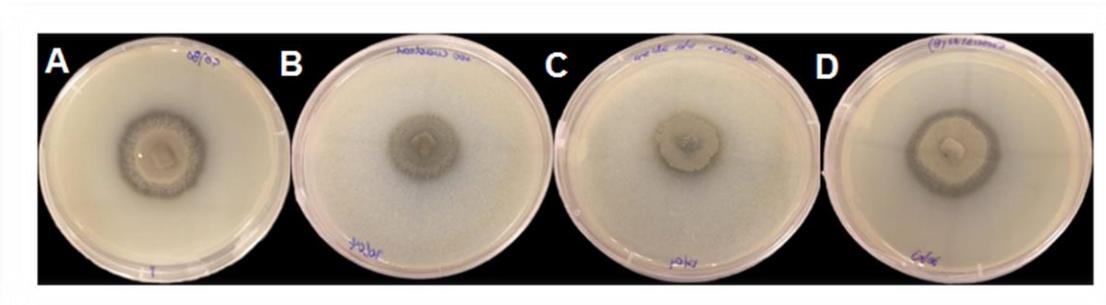
### 2.6.2 Detección del gen citocromo b (Cyt b) asociado a la resistencia a Qol

La detección molecular de la resistencia se ha propuesto mediante la amplificación del gen citocromo b (Cyt b) utilizando una serie de partidores específicos diseñados G143AMM0, G143AMM1, G143AMM2, y G143AMM4 (Fontaine *et al.*, 2008). Adicionalmente, estos mismos autores proponen la reacción de enzima de restricción (endonucleasa) *Fnu4HI*, mediante la digestión con la enzima del amplicón del gen Cyt b, obtenidos con los primers PS1/PR1. Es importante indicar que la resistencia genética de la mutación G143A, confiere alto nivel de resistencia a fungicidas inhibidores de la quinona (Qol). Una segunda mutación, es la F129L, cambio de la fenilalanina por leucina en la posición 129, y la mutación G137R que produce un cambio de glicina por arginina. Las mutaciones F129L y G137R confieren moderado niveles de resistencia (factor de resistencia de 5 a 15) a los fungicidas Qol (Banno *et al.*, 2009).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Aislados fungosos

Se utilizaron 22 aislados de *V. inaequalis* seleccionados que fueron obtenidos desde hojas y frutos con síntomas de sarna del manzano, provenientes de distintas localidades de huertos comerciales de manzano desde la Región del Maule hasta la Región de la Araucanía (Cuadro 3.1). Brevemente, los aislados se obtuvieron desde lesiones sarnosas activas desarrolladas en hojas y frutos, incubadas en condiciones de cámara húmeda por 2 días a 23°C, y luego conidias de cada lesión individual fueron colectadas en agua destilada estéril y sembradas en medio de cultivo Agar Rosa de Bengala modificado con antibióticos a 23°C, en oscuridad, por 10 días. Una vez obtenido el crecimiento fungoso, colonias individuales y puras fueron traspasadas a medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD), y mantenidas a 12°C por al menos 30 días, en oscuridad para ser utilizadas en los diferentes experimentos (Figura 3.1.).



**Figura 3.1.** Crecimiento micelial de aislados de *Venturia inaequalis* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD) después de 30 días de incubación a 12°C. **A**, aislado 1. **B**, aislado 18. **C**, aislado 19. **D**, aislado 5.

**Cuadro 3.1.** Origen de los aislados de *Venturia inaequalis* colectados desde la Región del Maule hasta la Región de la Araucanía utilizados en el presente estudio de sensibilidad.

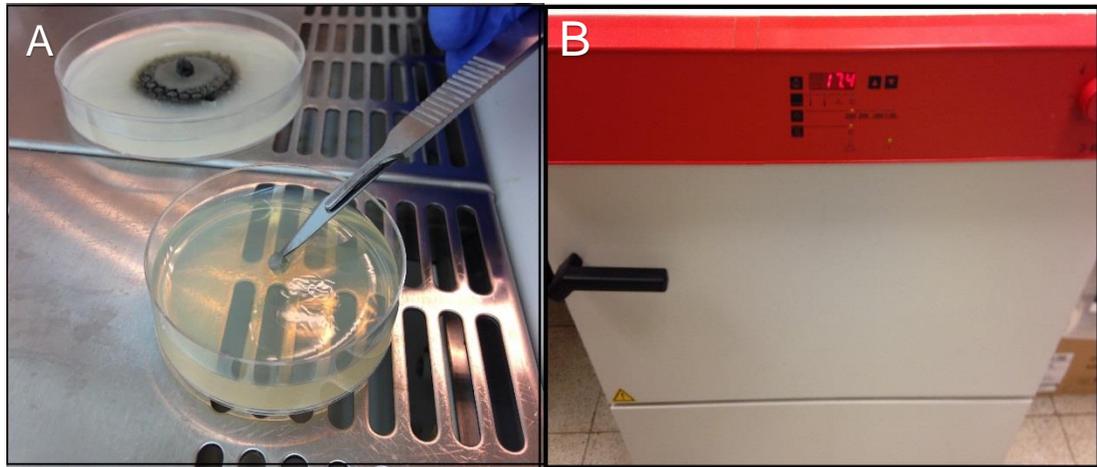
N°	Código	Localidad	Región	Cultivar
Aislado	Aislado			
1	A1	San Clemente	Del Maule	Fuji
2	A2	Yerbas Buenas	Del Maule	Fuji
3	A4	Angol	De la Araucanía	Cripps Pink
4	A7	Renaico	De la Araucanía	Cripps Pink
5	A8	Yerbas buenas	Del Maule	Cripps Pink
6	A10	Yerbas Buenas	Del Maule	Cripps Pink
7	A12	Molina	Del Maule	Brookfield
8	A14	Molina	Del Maule	Gala
9	A19	Molina	Del Maule	Granny Smith
10	A22	Linares	Del Maule	Brookfield
11	A25	Curicó	Del Maule	Fuji
12	A39	Molina	Del Maule	Brookfield
13	A41	Molina	Del Maule	Braeburn
14	A47	Molina	Del Maule	Fuji
15	A48	Yerbas buenas	Del Maule	Cripps Pink
16	A49	Yerbas buenas	Del Maule	Granny Smith
17	A50	Talca	Del Maule	Gala
18	A51	Collipulli	De la Araucanía	Fuji
19	A52	Teno	Del Maule	Cripps Pink
20	A53	Molina	Del Maule	Cripps Pink
21	A54	Río Claro	Del Maule	Fuji
22	A55	Linares	Del Maule	Cripps Pink

### 3.2. Fungicidas

Para el estudio de sensibilidad, se utilizaron los ingredientes activos de fungicidas difenoconazole (Dominio 25 EC, Anasac, Chile), pirimetanil (Bonnus 400 SC, Anasac, Chile) y trifloxiestrobil (Flint 50% WG, Bayer, Chile).

### 3.3. Determinación *in vitro* del CE50 de los aislados de *Venturia inaequalis*

Para la determinación de la CE50 en los aislados de *V. inaequalis*, se emplearon las concentraciones de 0 (testigo); 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 y 1 µg/ml (=ppm) de ingrediente activo difenoconazole y pirimetanil en medio de cultivo APD (2%) y Agar Gelatina Glucosa (GGA), respectivamente (Latorre y Torres, 2012). Para el ingrediente activo trifloxiestrobil se utilizaron las mismas concentraciones en medio APD pero adicionando 10 y 100 µg/ml de i. a. Para obtener las diferentes concentraciones de los tres fungicidas, se prepararon soluciones madres de 1000 µg/mL y 10 µg/mL con cada uno de los fungicidas. Después de autoclavar (121°C por 10 min) el correspondiente medio de cultivo líquido (500 ml), y enfriado a unos 60°C, se adicionó las diferentes cantidades de las concentraciones madres de los ingredientes activos, para obtener todas las concentraciones previamente señaladas. Una vez obtenidas las placas de Petri (90 mm de diámetro) con las diferentes concentraciones de fungicidas, en el centro de cada placa de Petri se colocó un trozo invertido de agar de 3 mm de diámetro con crecimiento activo de los aislados de 30 días de edad (incubación a 12°C) (Figura 3.2.). Inmediatamente después, estas placas se colocaron en una cámara de crecimiento con temperatura de 17°C con un régimen de oscuridad (Figura 3.2.). Después de los 30 días de incubación, a cada placa de Petri, se le determinó el diámetro de crecimiento micelial de cada aislado de *V. inaequalis*. El crecimiento relativo (CR, %), se determinó entre la relación = (crecimiento micelial (CM) del medio con fungicida / CM del medio sin fungicida) x 100. Para determinar la concentración efectiva para obtener un 50% de control (CE50), se realizó un análisis de regresión, en que X= el log de la concentración del fungicida e Y= el probit del % del CR (Latorre, 1989), a través del programa estadístico SPSS (versión 20, Chicago, E.E.U.U).



**Figura 3.2.** Procedimiento determinación *in vitro* del CE50 de los aislados de *Venturia inaequalis*. **A**, Siembra de trozo invertido de agar de 3 mm de diámetro de aislado de *V. inaequalis* de 30 días de edad, sobre placa de Petri con fungicida difenoconazole. **B**, Cámara de crecimiento en donde se incuban los aislados de *V. inaequalis* a 17 °C.

#### 3.4. Determinación molecular de la resistencia a trifloxiestrobina

La identificación molecular de los 22 aislados se realizó mediante la extracción en frío de su ADN, mediante la metodología propuesta por Espinoza (2016), y utilizando el kit de extracción (Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega). La amplificación del gen citocromo b (Cyt b) se realizó con los partidores PS1, G143AMM1, G143AMM2, G143AMM3 y G143AMM4 (Cuadro 3.2), propuestos por Fontaine *et al.* (2008). El producto PCR se envió para su purificación y secuenciación a Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com), Corea del Sur). Las secuencias de los 22 aislados de *V. inaequalis*, se limpiaron eliminando las colas de nucleótidos fuera de los partidores y editando las secuencias con el programa Bioedit (v. 7.1.3.0; Tom Hall, Isis Pharmaceutical Inc. E.E.U.U), obteniendo secuencias de consenso para gen citocromo b. Las secuencias de los aislados de *V. inaequalis* se compararon con secuencias depositadas en el GenBank mediante el alineamiento básico de secuencias (Blastn) del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). Se consideró la identidad a nivel de especie cuando se obtuvo >97% de similitud con las especies depositadas de referencias en la base de datos del GenBank.

Para confirmar la detección de la mutación, el producto PCR obtenidos con los partidores PS1/PR1, se digirió con la enzima de restricción Fnu4HI (5'-GCTGC-3') previa incubación a 37°C, durante 24 h (Fontaine *et al.*, 2008). Al término de la incubación se realizó una electroforesis en

gel de agarosa al 2% (2 g de agarosa por 100 mL de buffer TAE al 1X). Una vez solidificado el gel, a cada pocillo del gel, se le agregó 6 µL de mezcla de la muestra del producto PCR + enzima (3 µL) y buffer de carga (3 µL). También se colocó en uno de los pocillos un indicador de referencia de peso molecular 100-1000 pb (Invitrogen, Ladder 100 pb, E.E.U.U.). Luego se cargó eléctricamente con 120 mV (fuente de poder, 75.1214 Class II, Continental Lab Products, Inc.) el gel de agarosa desde un polo negativo a un polo positivo, por aproximadamente 60 minutos. Finalmente se visualizó el gel de agarosa en un transluminizador de UV (ECX-26.M Viber Lourmat, Francia).

**Cuadro 3.2.** Partidores específicos para la detección de la mutación del sitio G143A del gen citocromo b (Cyt b) en aislados de *Venturia inaequalis* para determinar resistencia a trifloxiestrobilina.

PARTIDORES	ORIENTACIÓN	SECUENCIA
PS1	forward	GTTACAGCCTTCCTGGGTTAT
PR1	reverse	AGGCCTCCCCACAGAAATTCG
G143AMM0	reverse	GGTTTGTGATGACAGTTGCAG
G143AMM1	reverse	GGTTTGTGATGACAGTTGCTG
G143AMM2	reverse	GGTTTGTGATGACAGTTACAG
G143AMM3	reverse	GGTTTGTGATGACAGTTGTAG
G143AMM4	reverse	GGTTTGTGATGACAGTTGGAG

### 3.5. Diseño de experimento

Para el ensayo de sensibilidad *in vitro* en aislados de *V. inaequalis*, se utilizó un diseño completamente al azar. La unidad experimental correspondió una placa de Petri, donde para cada aislado y cada concentración se utilizaron 5 repeticiones. El ensayo fue repetido en los 22 aislados.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Prueba *in vitro*

Los valores obtenidos de dos repeticiones del experimento *in vitro* no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,01$ ), por lo tanto, los datos fueron promediados. De acuerdo a la evaluación de los distintos aislados de *Venturia inaequalis* en medio APD y GGA, se obtuvieron los siguientes resultados, según fungicida.

#### **Difenoconazole**

Todos los aislados de *V. inaequalis* presentaron crecimiento en el medio de cultivo APD. Para el ingrediente activo difenoconazole, los CE50 estimadas para los 22 aislados de *V. inaequalis*, fluctuaron entre 0,001 y 0,102  $\mu\text{g/ml}$ . Cinco aislados (22,7%) de *V. inaequalis* presentaron crecimiento sobre 0,04  $\mu\text{g/ml}$  (Henríquez *et al.*, 2011), por lo que estarían presentando pérdida de sensibilidad *in vitro* al fungicida difenoconazole. Los cinco aislados con pérdidas de sensibilidad fluctuaron entre CE50 de 0,042 y 0,102  $\mu\text{g/ml}$  y provienen de huertos comerciales ubicados en la Región del Maule (Cuadro 4.1). El aislado silvestre Awild obtuvo una CE50 de 0,001  $\mu\text{g/ml}$ . El factor de resistencia (CE50 población comercial/CE50 población no comercial) para los aislados con pérdida de sensibilidad fue del rango de 42 a 102.

#### **Pirimetanil**

Todos los aislados de *V. inaequalis* presentaron crecimiento micelial en el medio de cultivo GGA. Para el ingrediente activo pirimetanil, los CE50 estimadas para los 22 aislados de *V. inaequalis*, fluctuaron entre 0,001 y 2,758  $\mu\text{g/ml}$ . Cinco aislados (22,7%) de *V. inaequalis* presentaron crecimiento sobre 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , por lo que estarían presentando pérdida de sensibilidad *in vitro* al fungicida pirimetanil propuesto por Koller *et al.* (2005). Los cinco aislados con pérdidas de sensibilidad fluctuaron con CE50 de 0,201 a 2,758  $\mu\text{g/ml}$  (Cuadro 4.1). El aislado silvestre Awild obtuvo un valor de CE50 de 0,0032  $\mu\text{g/ml}$ . El factor de resistencia para los aislados con pérdida de sensibilidad fue del rango de 62 a 861.

#### **Trifloxiestrobil**

Todos los aislados de *V. inaequalis* presentaron crecimiento micelial en el medio de cultivo APD. Para el ingrediente activo trifloxiestrobil, los CE50 estimadas para todos los aislados de *V. inaequalis* obtenidos de huertos comerciales fluctuaron entre 0,010 y 246,3  $\mu\text{g/ml}$ . Once aislados

(50%) de *V. inaequalis* presentaron crecimiento sobre 2,0 µg/ml, por lo que estarían presentando pérdida de sensibilidad *in vitro* al fungicida trifloxiestrobil propuesto por Koller *et al.* (2004). Los once aislados con pérdidas de sensibilidad fluctuaron con CE50 de 10,3 a 246,3 µg/ml (Cuadro 4.1). El aislado silvestre Awild obtuvo un valor de CE50 de 0,029 µg/ml. El factor de resistencia para los aislados con pérdida de sensibilidad fue del rango de 355 a 8493.

**Cuadro 4.1.** Valores de concentración efectiva del 50% (CE50, µg/ml) del crecimiento micelial a los ingredientes activos difenoconazole, pirimetanil y trifloxiestrobil, y reacción a la enzima de restricción (enzima Fnu4HI) asociada a la presencia de la mutación G143A del gen Cyt b (confiere resistencia a fungicidas inhibidores de la Quinona, Qol), de 22 aislados de *Venturia inaequalis* obtenidos en la Región del Maule y Región de la Araucanía.

CE50 (µg/ml)						
Código Aislado	Localidad	Cultivar	Difenoconazole <sup>1</sup>	Pirimetanil <sup>2</sup>	Trifloxiestrobil <sup>3</sup>	PS1 PR1 + Enzima Fnu4HI
A1	San Clemente	Fuji	0,013	0,165	<b>16,5 (568)</b>	+
A2	Yerbas Buenas	Fuji	0,001	0,001	0,02	-
A4	Angol	Cripps Pink	0,001	0,188	<b>73,2 (2524)</b>	+
A7	Renaico	Cripps Pink	0,001	0,015	<b>14,5 (500)</b>	+
A8	Yerbas buenas	Cripps Pink	0,022	0,162	<b>15,5 (534)</b>	+
A10	Yerbas Buenas	Cripps Pink	0,014	0,013	<b>136,4 (4703)</b>	+
A12	Molina	Brookfield	0,018	0,001	<b>246,3 (8493)</b>	+
A14	Molina	Gala	0,026	<b>0,212 (66)</b>	0,159	-
A19	Molina	Granny Smith	<b>0,042 (42)<sup>5</sup></b>	<b>1,621 (506)</b>	0,010	-
A22	Linares	Brookfield	0,001	0,045	0,145	-
A25	Curicó	Fuji	<b>0,099 (99)</b>	<b>0,218 (68)</b>	0,015	-
A39	Molina	Brookfield	0,024	0,181	0,021	-
A41	Molina	Braeburn	0,033	0,106	<b>20,8 (717)</b>	+
A47	Molina	Fuji	0,011	0,190	<b>113,9 (3927)</b>	+
A48	Yerbas buenas	Cripps Pink	0,015	0,197	<b>16,5 (568)</b>	+
A49	Yerbas buenas	Granny Smith	<b>0,102 (102)</b>	<b>0,201 (62)</b>	0,131	-
A50	Talca	Gala	0,005	<b>2,758 (861)</b>	0,065	-
A51	Collipulli	Fuji	0,012	0,109	0,017	-

A52	Teno	Cripps Pink	<b>0,047 (47)</b>	0,124	0,014	-
A53	Molina	Cripps Pink	0,017	0,180	<b>138,1 (4762)</b>	<b>+</b>
A54	Río Claro	Fuji	0,004	0,144	<b>10,3 (355)</b>	<b>+</b>
A55	Linares	Cripps Pink	<b>0,059 (59)</b>	0,173	0,144	-
Awild <sup>4</sup>	Colin	Fuji	0,001	0,0032	0,029	-
		<b>Promedio</b>	<b>0,025</b>	<b>0,305</b>	<b>34,9</b>	
		<b>Desv estándar</b>	<b>0,029</b>	<b>0,624</b>	<b>64,0</b>	
		<b>Min</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,010</b>	
		<b>Max</b>	<b>0,102</b>	<b>2,758</b>	<b>246,3</b>	

<sup>1</sup>Aislados de *V. inaequalis* con valores de CE50 iguales o superiores a 0,04 µg/ml de difenoconazole son considerados con pérdida de sensibilidad (Henríquez *et al.*, 2011).

<sup>2</sup>Aislados de *V. inaequalis* con valores de CE50 iguales o superiores a 0,2 µg/ml de pirimetanil son considerados con pérdida de sensibilidad (Koller *et al.*, 2005).

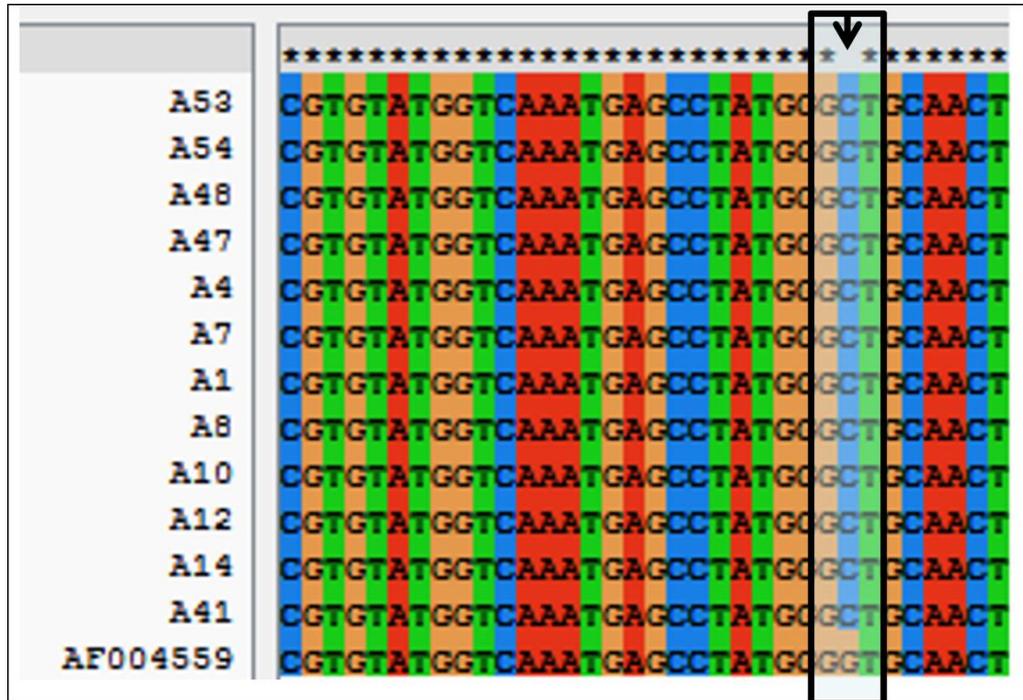
<sup>3</sup>Aislados de *V. inaequalis* con valores de CE50 iguales o superiores a 2,0 µg/ml de trifloxiestrobil son considerados con pérdida de sensibilidad (Koller *et al.*, 2004).

<sup>4</sup>Se incluyó en el análisis de sensibilidad un aislado silvestre (libre de aplicaciones de fungicidas) Awild, obtenido previamente como aislado de *V. inaequalis* sensible a fungicidas (Méndez, 2015).

<sup>5</sup>Los valores entre parentesis corresponden al factor de resistencia (fr) obtenido de la relación entre CE50 aislado evaluado/CE50 aislado silvestre.

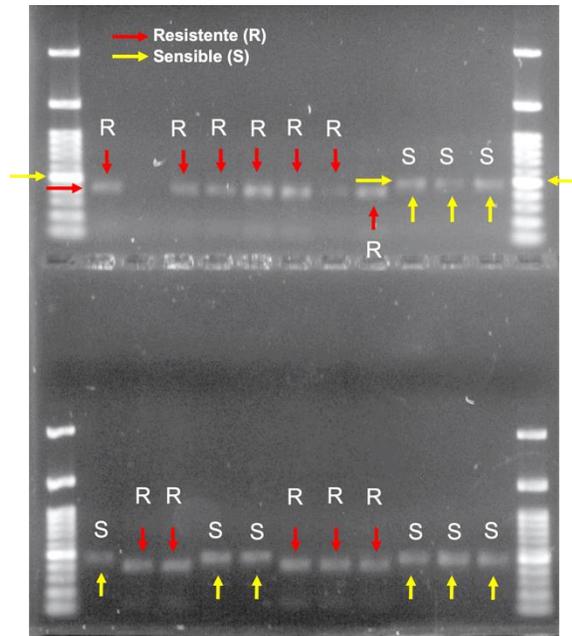
#### 4.2. Detección molecular de la mutación G143A del gen Cyt b

Las amplificaciones fueron exitosas en los 22 aislados analizados de *V. inaequalis*, ratificando que todos corresponden a la especie *Venturia inaequalis* con 100% de similitud con el aislado de referencia de *V. inaequalis* AF004559. La secuenciación de las secuencias amplificadas con los partidores G143AMM1 a G143AMM4 permitió detectar la posición de la mutación solo en 11 aislados (Figura 4.1). El cambio de la base de guanina (G) por citosina (C) en la posición 143, implica el cambio del aminoácido glicina por alanina.



**Figura 4.1.** Alineamiento parcial de secuencias de consenso de aislados de *Venturia inaequalis* del gen citocromo b, que muestra el cambio de la posición 143 de guanina por citosina, produciendo un cambio de aminoácido de glicina a alanina, confiriendo una resistencia a fungicidas inhibidores de la quinona (QoI, respiración celular) como trifloxiestrobil. Aislado de referencia AF004559 de *V. inaequalis* sin mutación genética, disponible en GenBank.

La confirmación de la detección de la mutación en las secuencias de los aislados de *V. inaequalis*, fue ratificado con la reacción positiva a la reacción con la enzima de restricción FnuHI de 11 aislados que presentan la mutación G143A del gen Cyt b (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Gel de agarosa de la reacción de la digestión con la enzima de restricción Fnu4HI del producto PCR generado con los partidores PS1/PR1 en aislados de *Venturia inaequalis* obtenidos en la Región del Maule y de la Araucanía. Los aislados sensibles (S) presentan un fragmento no cortado (500 pb) y aislados resistentes (R) en fragmento cortado (400 pb).

## V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la sensibilidad *in vitro* de aislados de *Venturia inaequalis* obtenidos principalmente en la Región del Maule indican una resistencia establecida al fungicida trifloxiestrobil (Qol) (50%, 11 aislados) y pérdida de sensibilidad en cinco aislados (22%) a los fungicidas difenoconazole (DMI) y pirimetanil (anilino pirimidina). Este trabajo constituye la primera determinación genética de resistencia a Qol, determinando una alta resistencia a trifloxiestrobil a nivel nacional.

La resistencia a trifloxiestrobil (Qol) determinada en el actual trabajo, ratifica las determinaciones de resistencia *in vitro* obtenidas en los trabajos de Sallato *et al.* (2006) y Méndez (2015), quienes demostraron una resistencia en aislados de *V. inaequalis* al fungicida kresoxim-metil (Qol) y trifloxiestrobil, respectivamente. Sin embargo, solo en el actual trabajo a nivel nacional se ratificó la resistencia a nivel molecular de trifloxiestrobil, detectando la mutación G143A del gen Cyt b (Lesniak *et al.*, 2011). Por lo tanto, el presente trabajo concuerda con varios trabajos internacionales que determinaron la presencia de aislados de *V. inaequalis* resistente a los fungicidas Qol después de al menos 9-10 años del uso intensivo de estos fungicidas en huertos comerciales de manzanos en Uruguay (Mondino *et al.*, 2015), Michigan y New York, E.E.U.U (Lesniak *et al.*, 2011; Villani y Cox, 2014), Italia (Fiaccadori *et al.*, 2011), Francia (Fontaine *et al.*, 2008).

En cuanto al análisis molecular, se detectaron 11 (50%) aislados de *V. inaequalis* que presentaron la mutación G143A del gen Cyt b, lo que demuestra la resistencia a nivel genético a los fungicidas Qol (Fontaine *et al.*, 2008). Esta mutación puntual ocurre en el gen del citocromo b mitocondrial (Cyt b) produciendo un cambio de glicina a alanina en la posición 143 de la proteína 'G143A', asociados en aislados de *Venturia* que presentan altos niveles de resistencia a los fungicidas inhibidores de la quinona (Qol) con un factor de resistencia (FR) > 100 (Gisi *et al.*, 2002). En este sentido, todos los aislados *V. inaequalis* detectados a nivel genético coinciden con niveles de FR entre 355 a 8000. Similarmente a esto, se obtuvieron aislados de *V. inaequalis* de distintos huertos del noreste de Estados Unidos a los cuales se les hicieron pruebas de crecimiento micelial y análisis molecular a través de PCR, comprobando la resistencia del patógeno ante trifloxiestrobil (Frederick *et al.*, 2014). Otro respaldo que concuerda con el reciente trabajo es el de Lesniak *et al.*, (2011), donde indican la presencia generalizada de la resistencia en poblaciones de *V. inaequalis* a Qol en huertos de manzanas comerciales en el estado de Michigan, siendo así el primer informe publicado en Estados Unidos referente a la resistencia por la mutación G143A. Estas poblaciones resistentes se detectaron nueve años después del registro

de uso de fungicidas Qol en manzanas, lo que probablemente condujo al desarrollo y expansión de estas poblaciones resistentes.

Sin embargo, se han obtenido aislados de *V. inaequalis* que presentan un alto nivel de resistencia a Qol, en ausencia de la mutación G143A, lo que daría a conocer que existen mutaciones adicionales en genes que codifican componentes del complejo del citocromo bc1, lo que en algunos casos provocaría discrepancia entre ensayos de germinación de esporas y detección molecular de la mutación G143A, y lo que indicaría que está operando un mecanismo de resistencia alternativo (Fotaine *et al.*, 2008). En este sentido, en el trabajo de Fiaccadori *et al.* (2011), detectaron una resistencia genética en aislados que no estaban expuestos a aplicaciones de fungicidas. Esto ratifica que dentro de una población hay aislados que naturalmente son resistentes.

En el presente trabajo se obtuvieron algunos aislados (22%) de *V. inaequalis* con pérdida de sensibilidad al fungicida difenoconazole (DMI) al exceder la dosis discriminadora de 0,04 µg/ml de difenoconazole (Henríquez *et al.*, 2011). En estos huertos comerciales donde se detectaron estos aislados de *V. inaequalis*, tienen un historial de aplicaciones de fungicidas DMI de al menos 8 años. La resistencia a fungicidas DMI en *V. inaequalis* fue descrita por Koller *et al.* (1997) en E.E.U.U, quienes determinaron poblaciones de *V. inaequalis* con niveles de resistencia a miclobutanil y fenarimol, siendo que fueron huertos con aplicaciones reiteradas de miclobutanil, demostrando una resistencia cruzada en fungicidas DMI (FRAC, 2019). Aunque, Villani *et al.* (2015), indican que aislados resistentes a miclobutanil aún mostraban sensibilidad a difenoconazole. En cambio, en el trabajo de Nueva Zelanda de Beresford *et al.* (2013), obtuvieron aislados resistentes a miclobutanil y penconazole, pero sensibles a difenoconazole. En el trabajo de Mondino *et al.* (2015) quienes determinaron pérdida de sensibilidad, al obtener aislados de *V. inaequalis* con valores de FR desde 6,6 a 11,7, a diferencia del actual trabajo, donde se obtuvo aislados con valores de FR de 42 a 102. Previamente en Chile, Henríquez *et al.* (2011), obtuvieron valores de FR de 4.7. Es necesario ratificar estos valores mediante el análisis genético para determinar la resistencia a los fungicidas DMI con la detección del gen CYP51A1 (Schnabel y Jones, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos, cinco aislados de *V. inaequalis* presentaron pérdida de sensibilidad a pirimetanil (anilino pirimidina), logrando valores de CE50 mayor a 0,2 µg/ml, con FR de 66 a 861. Previamente, Koller *et al.* (2005), demostraron la amplia sensibilidad de aislados de *V. inaequalis* a los fungicidas pirimetanil y ciprodinil en Nueva York, pero no detectaron poblaciones con pérdida de sensibilidad a anilino pirimidina. También, en este trabajo determinaron que aislados de *V. inaequalis* con resistencia a DMI (miclobutanil), presentaron una

reducción en la sensibilidad a pirimetanil y ciprodinil (Koller *et al.*, 2005), similar a lo obtenido en el actual estudio, donde tres aislados presentaron pérdida de sensibilidad a DMI (difenoconazole) y anilinopirimidina (pirimetanil).

Por esta razón, que un manejo que proponga una rotación de moléculas de distinto grupo de fungicidas (sitio específico y sitio múltiple) y no exceder más de dos aplicaciones de una misma molécula (en sitio específicos), junto con una aplicación oportuna en la temporada, es una estrategia anti-resistencia que permite tener un control eficaz y sostenido en el tiempo (FRAC, 2019).

## VI. CONCLUSION

Basado en los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que:

- Once aislados (50%) de *Venturia inaequalis* mostraron resistencia al fungicida trifloxiestrobil, determinado en forma *in vitro* y genéticamente al detectar la mutación del sitio G143A del gen Cyt b.
- Cinco aislados de *Venturia inaequalis* mostraron pérdida de sensibilidad a los fungicidas difenoconazole (DMI) y pirimetanil (anilinopirimidina) al exceder los valores de CE50 de 0,04 y 0,2 µg/ml, respectivamente.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, I. 1991. Principales enfermedades que afectan al manzano en la décima región. Programa fitopatología. IPA Remehue N°15. [En Línea]. Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/IPA/NR13793.pdf>. Consultado el 20 de abril de 2017.

Agrimundo. 2018. Disminuye la producción mundial de manzanas. Departamento de Asuntos Internacionales de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. ODEPA. [En Línea]. Disponible en: [file:///C:/Users/Pauli/Downloads/Disminuye\\_la\\_produccion\\_mundial\\_de\\_manzanas.pdf](file:///C:/Users/Pauli/Downloads/Disminuye_la_produccion_mundial_de_manzanas.pdf). Consultado el 16 de abril de 2019.

Agrios, G. 2007. Fitopatología. Catedrático, Departamento de Fitopatología. Universidad de Massachusetts. 2da edición, p. 409-412.

Banno, S., Yamashita, K., Fukumori, F., Okada, K., Uekusa, H., Takagaki, M., Kimura, M. and Fujimura, M. 2009. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene. Plant Pathology.

Bayer CropScience, 2013. Etiqueta Scala® 400 SC. Chile. [En Línea]. Disponible en: [http://www.cropscience.bayer.cl/upfiles/etiquetas/Scala\\_400\\_SC\\_\(02-05-13\).pdf](http://www.cropscience.bayer.cl/upfiles/etiquetas/Scala_400_SC_(02-05-13).pdf). Consultado el 26 de mayo de 2017.

Bayer CropScience, 2014. Ficha producto Flint® 50% WG. Santiago, Chile. [En Línea]. Disponible en: <http://www.cropscience.bayer.cl/soluciones/fichaproducto.asp?id=144>. Consultado el 27 de mayo de 2017.

Beresford, R. M., Wright, P., J., Wood, P. N., Parl, N. M., Larsen, N. J., and Fisher, B. M. 2013. Resistance of *Venturia inaequalis* to demethylation inhibitor and dodine fungicides in four New Zealand apple -growing regions. New Zealand Plant Protection 66: 274-283.

Chapman, K. S., Sundin, G. W., and Beckerman, J. L. 2011. Identification of resistance to multiple fungicides in field populations of *Venturia inaequalis*. Plant Disease 95:921-926.

Choque, G., y Chavarría, J. 2014. Producción de manzana. Texto guía del participante. Cooperación Suiza en Bolivia. Sucre, Bolivia. [En Línea]. Disponible en: <http://www.formaciontecnicabolivia.org/webdocs/publicaciones/2015/manzanosweb.pdf>. Consultado el 25 de mayo de 2017.

Echenique, M. 2017. Manzana, un mercado de alta competitividad y complejidad. Red agrícola. [En Línea]. Disponible en: <http://www.redagricola.com/cl/un-mercado-de-alta-competitividad-y-complejidad/>. Consultado el 16 de abril de 2019.

Espinosa, C. 2016. Identificación molecular de *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila* y *Phacidium lacerum* asociados a pudriciones de pre-cosecha en manzanas cvs. Cripps Pink y Fuji. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. Talca, Chile. 35p.

Fiaccadori, R., Cicognani, E.M., Alberoni, G., Collina, M., and Brunelli, A. 2011. Sensitivity to strobilurin fungicides of Italian *Venturia inaequalis* populations with different origin and scab control. *Pest management Science* 67:535-540.

Fontaine, S., Remuson, F., Fraissinet-Tachet, L., Micoud, A., Marmeisse, R. and Melayah D. 2008. Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays. *Pest Management Science* 65: 74-81.

Frederick, Z. A., Villani, S. M., Cooley, D. R., Biggs, A. R., Raes, J. J., and Cox, K. D. 2014. Prevalence and Stability of Qualitative QoI Resistance in Populations of *Venturia inaequalis* in the Northeastern United States. *Plant Disease* 98: 1122-1130.

Fungicide resistance action committee (FRAC). 2019. FRAC Code List 2019: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including FRAC Code numbering). [En Línea]. Disponible en: [http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019.pdf?sfvrsn=98ff4b9a\\_2](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019.pdf?sfvrsn=98ff4b9a_2). Consultado el 18 de abril de 2019.

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

Henríquez, J., Sarmiento, O. and Alarcón, P. 2011. Sensitivity of *Venturia inaequalis* chilean isolates to difenoconazole, fenarimol, mancozeb, and pyrimethanil. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(1):39-44.

Jones, A. L., and Walker, R. J. 1976. Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine and benzimidazole fungicides in Michigan. *Plant Disease Report* 60:40- 44.

Köller, W., Parker, D. M., Turechek, W. W., Avila-Adame, C., and Cronshaw, K. 2004. A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxym-methyl and trifloxystrobin. *Plant Disease* 88:537-544.

Köller, 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.

Köller, W., Wilcox, W. F., 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 Färber, R., Min Chin, K. and Leadbitter, N. 2002. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Management Science* 58 (3):261-267.

Latorre, B. A. 2004. *Enfermedades de las plantas cultivadas*. Sexta Edición, Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 639p.

Latorre, B.A. 1989. *Fungicidas y Nematicidas. Avances y aplicabilidad*. Primera Edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 216 p.

Latorre, B.A., and Torres, R. 2012. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection* 40:49-52.

Lesniak, K. E., Proffer, T. J., Beckerman, J. L., and Sundin, G. W. 2011. Occurrence of QoI resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* 95(8): 927-934.

Lolas, M., y Díaz, G. A. 2016. *Enfermedades de pre y postcosecha en manzanos*. Boletín técnico, Pomáceas. Volumen 16, Nº5. Universidad de Talca. Talca, Chile. [En Línea]. Disponible en: [http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin\\_Tecnico\\_Septiembre\\_2016.pdf](http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/Boletin_Tecnico_Septiembre_2016.pdf). Consultado el 20 de abril de 2017.

Méndez, Raúl. 2015. *Sensibilidad de aislados chilenos de Venturia inaequalis a distintos fungicidas utilizados en huertos comerciales de manzano*. Tesis de grado presentada para optar al grado de Magíster en Horticultura. Universidad de Talca. Talca, Chile. 35 p.

Mondino, P., Casanova, L., Celio, A., Betancur, O., Leoni, C., and Alaniz, S. 2015. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin and difenoconazole in Uruguay. *Journal of Phytopathology* 163:1-10.

Mondino, P., Casanova, L., Celio, A., Leoni, C. y Alaniz, S. 2014. *Situación de la resistencia a trifloxystrobin y difenoconazole de poblaciones de venturia inaequalis en Uruguay, estrategias de manejo antirresistencia*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Programa Nacional de Investigación en Producción Frutícola, INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay. [En Línea]. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/1125/1/128221131113110119.pdf>. Consultado el 27 de mayo de 2017.

Muñoz, M. 2018. Boletín fruta fresca. Octubre 2018. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). Ministerio de agricultura. Gobierno de Chile. Santiago, Chile. [En Línea]. Disponible en: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoimMmVjODFhMmltODlwOS00ZTIhLTkyZTgtNjk0ZTQ4NzAzNTIyIiwidCI6IjMzYjdmNzA3LTZINmYtNDJkMi04ZDZmLTk4YmZmOWZiNWZhMCIslmMiOjR9>. Consultado el 16 de abril de 2019.

Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). 2013. Manzanas: una temporada de alto valor de exportaciones. Ministerio de agricultura. Gobierno de Chile. [En Línea]. Disponible en: [http://www.odepa.cl/wp-content/files\\_mf/138124860212431.pdf](http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/138124860212431.pdf). Consultado el 25 de mayo de 2017.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2018. Superficie plantada nacional, regional, numero de huertos e infraestructura frutícola. Estadísticas Productivas. Estadísticas de frutales. Ministerio de agricultura. Gobierno de Chile, Santiago, Chile. [En Línea]. Disponible en: <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas>. Consultado el 16 de abril de 2019.

Pacheco, L., 2009. Determinación de nutrientes en manzanas las variedades Fuji Royal, Granny Smith y Fuji en frutos libres y afectados por BitterPit". Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. [En Línea]. Disponible en: [http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-pacheco\\_l/pdfAmont/qf-pacheco\\_l.pdf](http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-pacheco_l/pdfAmont/qf-pacheco_l.pdf). Consultado el 20 de abril de 2017.

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

Schnabel, G., and Jones, A. L. 2007. The 14 alpha-demethylase(CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* 91:102-110.

Sutton, T. B., Aldwinckle H. S., Agnello A. M., and Walgenbach, J. F. 2014. Compendium of apple and pear diseases and pests. Second edition. American Phytopathological Society (APS), Minnesota, USA. 224 p.

Syngenta, 2017. Etiqueta SCORE ® 250 EC. Santiago, Chile. [En Línea]. Disponible en: <https://www.syngenta.cl/file/3406/download?token=abQb3jkh>. Consultado el 27 de mayo de 2017.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud. Investigación en discapacidad*. Vol. 2, Núm. 2. p.70-78. [En Línea]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>. Consultado el 01 de abril de 2019.

Villani, S. M., Biggs, A. R., Cooley, D. R., Raes, J. J., and Cox, K. D. 2015. Prevalence of myclobutanil resistance and difenoconazole insensitivity in populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* 99:1526-1536.