

## RESISTENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Phytophthora infestans* AL METALAXYL EN EL CULTIVO DE LA PAPA EN COSTA RICA<sup>1/\*</sup>

Oswaldo Páez\*, Luis Gómez\*\*, Arturo Brenes\*\* y Roberto Valverde<sup>2/\*\*</sup>

**Palabras clave:** *Phytophthora infestans*, papa, metalaxyl-M, Ridomil Gold, CE<sub>50</sub>, Costa Rica.

### RESUMEN

Un total de 118 aislamientos de *Phytophthora infestans* se recolectaron entre julio de 1999 y enero de 2000 en las 2 principales zonas productoras de papa en Costa Rica, Norte de Cartago y Zarcero. La resistencia de los aislamientos se evaluó *in vitro* midiendo el crecimiento radial del micelio en un medio suplementado con metalaxyl. Los aislamientos se clasificaron como resistentes, intermedios o sensibles; 75 aislamientos (64%) fueron resistentes al metalaxyl y 43 (36%) fueron sensibles a este fungicida. No se encontraron aislamientos intermedios. La frecuencia de aislamientos resistentes varió marcadamente entre zonas. En Cartago, la relación de aislamientos resistentes:sensibles fue aproximadamente de 1:1, mientras que en Zarcero fue de 7:1. No se observó ningún cambio en la frecuencia de los aislamientos resistentes durante los 3 períodos de muestreo. Los aislamientos resistentes de ambas zonas mostraron una CE<sub>50</sub> similar, mientras que los aislamientos sensibles de Zarcero mostraron una CE<sub>50</sub> mayor que los aislamientos sensibles de Cartago. Con el fin de evaluar el fungicida metalaxyl-M, enantiómero activo del metalaxyl, en julio del 2000 se recolectaron 29

### ABSTRACT

**Resistance of isolates of *Phytophthora infestans* to metalaxyl in potato crops of Costa Rica.** A total of 118 isolates of *Phytophthora infestans* was collected between July 1999 and January 2000 in the 2 main potato production zones of Costa Rica, Northern Cartago and Zarcero. Resistance to metalaxyl was determined *in vitro* by measuring micelium radial growth on agar medium supplemented with fungicide. Isolates were classified as resistant, intermediate, or sensitive. Seventy-five isolates (64%) were resistant to metalaxyl and 43 isolates (36%) were sensitive to this fungicide. No intermediate isolates were found. Resistance frequency varied markedly between production zones. The ratio of resistant:sensitive isolates was near 1:1 for Cartago whereas it was 7:1 for Zarcero. There was no apparent change in frequency of metalaxyl resistance among the sampling periods. Resistant isolates had a similar EC<sub>50</sub> in both zones whereas sensitive isolates from fields in Zarcero had a greater EC<sub>50</sub> value than isolates from Cartago. Other 29 isolates, collected from naturally-infected leaves of potato plants during July 2000, were evaluated for sensitivity to metalaxyl and metalaxyl-M. Isolates resistant to

1/ Recibido para publicación el 5 de marzo del 2001.

2/ Autor para correspondencia.

Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

\* Este trabajo es parte de la tesis M.Sc. del primer autor. Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícola y Recursos Naturales. Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

Apartado postal 2288-4050, Alajuela, Costa Rica.  
Correo electrónico: opaez@cariari.ucr.ac.cr

\*\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. Código Postal 2060, San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

nuevos aislamientos. Se determinó el nivel de resistencia para el metalaxyl-M y metalaxyl; los aislamientos mostraron el mismo nivel de resistencia para ambos fungicidas. Todos los aislamientos que resultaron resistentes al metalaxyl también fueron resistentes al metalaxyl-M, de igual forma los aislamientos sensibles al metalaxyl fueron sensibles al metalaxyl-M. La  $CE_{50}$  del metalaxyl fue mayor que la  $CE_{50}$  del metalaxyl-M.

## INTRODUCCION

El tizón tardío de la papa y tomate, causado por el patógeno oomicete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es considerado una amenaza para la seguridad alimentaria mundial (Neiderhauser 1999). En años recientes, ha existido un incremento en la incidencia y severidad de esta enfermedad y su manejo se ha hecho más difícil en muchas partes del mundo donde se cultiva papa (Fry y Goodwin 1997). Esta dificultad corresponde, en parte, a un aumento en la diversidad genética del patógeno y a la aparición de nuevos genotipos (Fry y Goodwin 1997), lo cual fue evidente a partir del descubrimiento del tipo de apareamiento A2 fuera de México y a la ocurrencia y diseminación de cepas resistentes al metalaxyl a principios de la década de los 80 (Fry y Spielman 1991, Gisi y Cohen 1996).

El metalaxyl es un fungicida fenilamida sistémico usado para el control de patógenos oomicetes (Urech et al. 1977), con ninguna acción sobre hongos verdaderos (Erwin y Ribeiro 1996). En los oomicetes se encuentran patógenos como *Phythium*, *Phytophthora*, *Pseudoperonospora* y *Albugo*. El metalaxyl tiene una acción específica sobre la ARN-polimerasa, interfiriendo con la síntesis del ARN (Fisher y Hayes 1982, Davidse et al. 1983). Este fungicida reduce el crecimiento micelial de *Phytophthora* sin afectar la germinación de esporangios y zoosporas (Fisher y Hayes 1982). El metalaxyl (Ridomil) fue introducido en Costa Rica a inicios de la década de los 80 para el control del tizón tardío, la resistencia del patógeno fue observada en el campo poco tiempo

metalaxyl were also resistant to metalaxyl-M. Likewise, isolates sensitive to metalaxyl were also sensitive to metalaxyl-M. Resistant isolates showed lower  $EC_{50}$  values to metalaxyl-M than metalaxyl.

después de iniciado su uso. Posteriormente, fue introducido el Ridomil MZ en el cual se mezcló el metalaxyl con el fungicida protector mancozeb. En la actualidad, se comercializa Ridomil Gold MZ en el cual se sustituyó el metalaxyl por su enantiómero activo, el metalaxyl-M.

Por ser el metalaxyl el fungicida más versátil y activo de los compuestos fenilamidas (Schwinn y Staub 1995), ha sido ampliamente usado contra *P. infestans* en papa y tomate, lo que ha llevado a que las nuevas poblaciones de este patógeno alrededor del mundo contengan aislamientos resistentes (Koh et al. 1994, Gisi y Gohen 1996, Forbes et al. 1997, Sedegui et al. 2000). Los aislamientos resistentes han mostrado ser igualmente o más agresivos que los individuos sensibles (Kadish y Cohen 1988ab, Bashan et al. 1989), convirtiéndose así la resistencia al metalaxyl, en una característica agronómica importante en el manejo integrado de esta enfermedad y usada como un marcador fenotípico para caracterizar poblaciones de *P. infestans* (Fry et al. 1993, Forbes et al. 1998). De esta manera, un manejo efectivo de la enfermedad depende en gran parte del conocimiento de la variabilidad de las poblaciones y un mejor entendimiento de los cambios en éstas (Daayf y Platt 1999, Fraser et al. 1999).

La variabilidad genética de *P. infestans* ha sido ampliamente investigada en México, debido a que este país es considerado su centro de diversidad (Goodwin et al. 1992, Tooley et al. 1985, Matuszak et al. 1994). Contrario a esto, poco se conoce acerca de la estructura poblacional de *P. infestans* en países de América Central. En Costa

Rica, los estudios sobre la caracterización de este patógeno son limitados e incluyen pocos aislamientos (Hohl e Iselin 1984, Goodwin et al. 1994, Sanchez et al. 2000). Sólo en el estudio de Sanchez et al. (2000), se evaluó la resistencia al metalaxyl con los aislamientos recolectados y se reportó un aislamiento de *P. infestans* resistente al metalaxyl de 2 aislamientos obtenidos de papa en Costa Rica. Ellos también reportaron 1 aislamiento resistente y 2 aislamientos con resistencia intermedia de 10 aislamientos recolectados de tomate. Sin embargo, pocas son las conclusiones que se pueden obtener de estos resultados acerca de la distribución y dinámica de la resistencia al metalaxyl.

El propósito del presente estudio fue determinar la resistencia de *P. infestans* al metalaxyl en las 2 principales zonas productoras de papa en Costa Rica y monitorear la frecuencia de resistencia en el tiempo. Como un objetivo adicional, se determinó si aislamientos de *P. infestans* resistentes a metalaxyl también eran resistentes a metalaxyl-M.

## MATERIALES Y METODOS

### Aislamiento del patógeno

Aislamientos de *P. infestans*, obtenidos de hojas de papa infectadas naturalmente, se recolectaron en las 2 principales zonas productoras de este cultivo en Costa Rica, Norte de Cartago y Zarcero. Cartago esta localizado 32 km Este de San José, mientras que Zarcero está localizado 50 km Noroeste de San José. Los aislamientos se recolectaron durante 3 períodos de muestreo: julio-agosto, setiembre-noviembre y diciembre-enero 2000. Debido a que actualmente no existe una metodología estándar para el muestreo de *P. infestans* y a la inexistencia local de información previa acerca de la resistencia del patógeno al metalaxyl, el muestreo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Gisi y Cohen (1996), considerando cada zona productora como una unidad agronómica independiente. Se recolectaron 79 aislamientos de campos de papa en la zona Norte de Cartago y 39 aislamientos de campos

de papa en la zona de Zarcero. Los aislamientos se recolectaron en diferentes campos de papa con síntomas de tizón tardío, seleccionados al azar.

Cada uno de los aislamientos provino de una sola lesión. Una sección de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tejido infectado se colocó entre 2 rodajas de tubérculo de papa, previamente desinfectado, y se incubó en una caja plástica cerrada, a 18°C y a la oscuridad. Después de una semana de incubación, se tomaron pequeñas cantidades del micelio que había crecido sobre las rodajas y se colocaron en un medio de centeno-B-agar (Caten y Jinks 1968), suplementado con los fungicidas PCNB 75% WP 67 mg/L y Benlate 50% WP 100 mg/L y con los antibióticos vancomicina 100 mg/L, ampicilina 200 mg/L y rifampicina 20 mg/L. Luego de 10-15 días, se obtuvo los cultivos puros en el medio de centeno-B-agar. Usando este procedimiento *P. infestans* fue aislado de más del 95% de las muestras recolectadas.

### Resistencia al metalaxyl

La resistencia al metalaxyl se determinó *in vitro* comparando el crecimiento radial de los aislamientos en medios de centeno-B-agar con y sin fungicida. El metalaxyl (grado técnico 70%) fue disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO) y añadido al medio de cultivo después de esterilizarlo en el autoclave (el tratamiento control sin fungicida fue suplementado con la misma cantidad de DMSO). Inicialmente, en una serie de 49 aislamientos se evaluaron 3 concentraciones de metalaxyl (0, 5 y 100 µg/ml) para determinar el nivel de resistencia. Posteriormente, en otra serie de 69 aislamientos se evaluaron 8 concentraciones de metalaxyl (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/ml) para determinar el nivel de resistencia y calcular la CE<sub>50</sub> (Concentración Efectiva= concentración a la cual el crecimiento relativo es el 50% del crecimiento del control).

De cada uno de los aislamientos puros, de una semana de incubación en centeno-B-agar, se tomaron discos de agar de 5 ó 9 mm de diámetro del borde de la colonia, lo cual representa la zona de crecimiento activo, y se colocaron en las concentraciones descritas anteriormente. Hubo 3 replicas por aislamiento en cada una de las concentraciones del fungicida. Los aislamientos se

incubaron a 18°C y a la oscuridad por 7-10 días. El crecimiento de la colonia se evaluó midiendo perpendicularmente 2 veces el diámetro de ésta (Figura 1). De acuerdo al crecimiento radial relativo de la colonia ( $[(DCF-DDI)*100]/[DSF-DDI]$ , donde DCF=diámetro promedio de la colonia en el medio con fungicida, DDI=diámetro del disco de inoçulación y DSF=diámetro promedio de la colonia en el medio sin fungicida), los aislamientos se clasificaron en 3 niveles de resistencia usando las concentraciones de 0, 5 y 100 µg/ml (Fraser et al. 1999) o las concentraciones de 0, 1 y 100 µg/ml (Therrien et al. 1993). Los aislamientos **sensibles** mostraron en 1 ó 5 y en 100 µg/ml un crecimiento radial menor al 40% del crecimiento radial del control. Los aislamientos **intermedios** mostraron en 1 ó 5 µg/ml un crecimiento radial mayor al 40% del crecimiento radial del control, pero en 100 µg/ml mostraron un crecimiento radial menor al 40% del crecimiento radial del control. Los aislamientos **resistentes** mostraron en 1 ó

5 y en 100 µg/ml un crecimiento radial mayor al 40% del crecimiento radial del control.

Se construyó un gráfico de acuerdo a Forbes et al. (1997), comparando los valores del crecimiento radial de los aislamientos en 1 ó 5 µg/ml contra los valores del crecimiento radial de los mismos aislamientos en 100 µg/ml. Los valores de la  $CE_{50}$  de 69 aislamientos fueron calculados usando una regresión lineal entre el  $\log_{10}$  del crecimiento radial relativo y el  $\log_{10}$  de la concentración del fungicida. Se realizó una prueba de Chi-cuadrado para determinar la relación entre ambas zonas productoras y los períodos de muestreo, sobre los niveles de resistencia.

#### Metalaxyl vs. metalaxyl-M

Con el fin de determinar la resistencia de aislamientos al metalaxyl y a su enantiómero activo metalaxyl-M, se evaluaron un total de 29 nuevos aislamientos de *P. infestans*. Los aislamientos se recolectaron en julio de 2000 de cultivos de

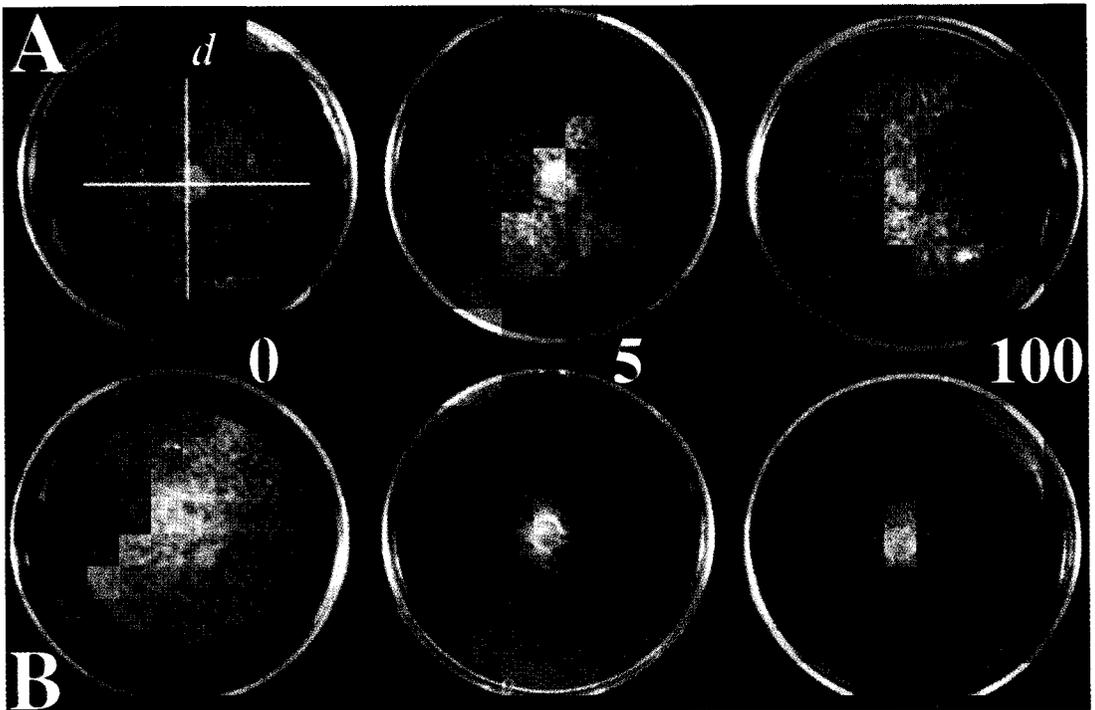


Fig. 1. Crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*. A = aislamiento resistente al metalaxyl. B = aislamiento sensible al metalaxyl. d = medidas tomadas perpendicularmente una de la otra.

papa en las zonas de Cartago y Zarcero. Se tomaron al azar 11 aislamientos resistentes de Cartago y 13 aislamientos resistentes de Zarcero. Se incluyeron 5 aislamientos sensitivos como un control de sensibilidad.

La resistencia a los fungicidas metalaxyl y metalaxyl-M se determinó usando 8 concentraciones de cada fungicida, como se describió en el experimento de metalaxyl. Para la prueba del metalaxyl-M se usó la fórmula comercial Ridomil Gold 480 EC (48% de metalaxyl-M), el cual se agregó directamente al medio estéril. Los valores promedio de la  $CE_{50}$  en cada fungicida se separaron según el intervalo de confianza ( $IC = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} ee$ , donde  $\bar{x}$ =promedio,  $t_{\alpha/2}=1.96$  y  $ee$ =error estándar). Se determinó el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) entre los valores de la  $CE_{50}$  del metalaxyl y del metalaxyl-M. Además, se determinó la distribución de los valores de la  $CE_{50}$  por una prueba de normalidad.

## RESULTADOS

### Resistencia al metalaxyl

Los aislamientos de *P. infestans* se establecieron exitosamente *in vitro* y su nivel de resistencia al fungicida metalaxyl fue evaluado (Figura 1). En total, 64 % de los aislamientos fue resistente al metalaxyl mientras que el restante 36% fue sensitivo (Cuadro 1). En este estudio no se encontraron aislamientos con un nivel de resistencia intermedia (Cuadro 1, Figura 2). En ambas zonas productoras se encontraron aislamientos resistentes y sensitivos, pero la frecuencia de éstos

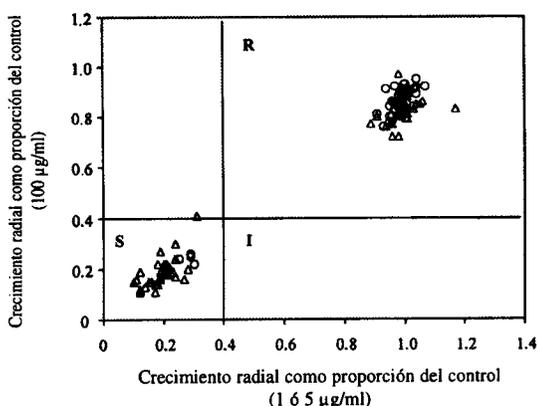


Fig. 2. Crecimiento radial de 118 aislamientos de *Phytophthora infestans*. Aislamientos recolectados en Cartago ( $\Delta$ ), aislamientos recolectados en Zarcero (O). R=resistente, I=intermedio y S=sensitivo. No se encontraron aislamientos intermedios.

varió marcadamente entre zonas ( $P = 0.0001$ ). En Cartago, 52% de los aislamientos fue resistente, mientras que en Zarcero, el 87% fue resistente (Cuadro 1). La relación de aislamientos resistentes:sensitivos fue de 1:1 en Cartago y de 7:1 en Zarcero.

Los aislamientos resistentes al metalaxyl se encontraron ampliamente distribuidos en la mayoría de localidades muestreadas en Cartago y Zarcero, las cuales comprendieron campos de papa con una altitud de 1350-3200 y 1400-2100 msnm, respectivamente. Estos resultados muestran como la resistencia tuvo una distribución geográfica general y ésta fue independiente de la altitud.

No hubo cambio aparente en la frecuencia de resistencia durante los 3 períodos de muestreo

Cuadro 1. Niveles de resistencia al metalaxyl de aislamientos de *Phytophthora infestans* recolectados en Cartago y Zarcero, Costa Rica.

Zona*	Nivel de resistencia**			Total
	R	I	S	
Cartago	41 (52)***	0 (0)	38 (48)	79 (100)
Zarcero	34 (87)	0 (0)	5 (13)	39 (100)
Total	75 (64)	0 (0)	43 (36)	118 (100)

\* Prueba de Chi-cuadrado entre zonas y nivel de resistencia fue significativa ( $P=0.0001$ ).

\*\* Nivel de resistencia de acuerdo a Therrien et al. (1993) y Fraser et al. (1999).

\*\*\* Números entre paréntesis son los porcentajes en cada línea.

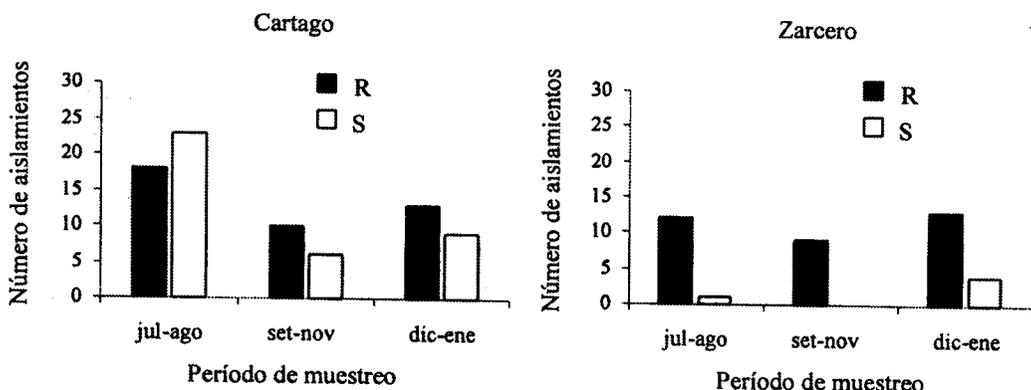


Fig. 3. Número de aislamientos resistentes (R) o sensibles (S) al metalaxyl, recolectados durante 3 períodos de muestreo en Cartago y Zarcero, Costa Rica. No se encontraron aislamientos intermedios. La prueba de Chi-cuadrado entre niveles de resistencia y período de muestreo no fue significativa (Cartago,  $P=0.69$ ; Zarcero,  $P=0.50$ ).

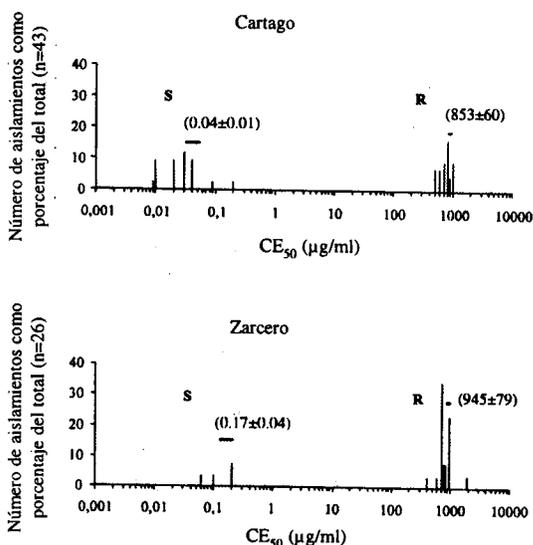


Fig. 4. Valores de la  $CE_{50}$  de 69 aislamientos de *Phytophthora infestans* en respuesta al metalaxyl. Los aislamientos fueron recolectados en Cartago y Zarcero, Costa Rica. S = aislamientos sensibles, R = aislamientos resistentes. Número entre parentesis y barras horizontales = promedio  $\pm$  ee.

(Cartago,  $P = 0.69$ , Zarcero,  $P = 0.50$ ). En Cartago, 18 (44%), 10 (62%) y 13 aislamientos (59%) fueron resistentes en cada período de muestreo, respectivamente (Figura 3). En Zarcero, el porcentaje de aislamientos resistentes fue de 92%, 100% y 76%, respectivamente (Figura 3).

El valor de la  $CE_{50}$  de los aislamientos varió de 0.01 a 2350  $\mu\text{g/ml}$ . Los aislamientos resistentes de Cartago mostraron una  $CE_{50}$  promedio similar a la  $CE_{50}$  promedio de los aislamientos resistentes de Zarcero (Figura 4). Sólo hubo diferencia entre los valores promedio de la  $CE_{50}$  de los aislamientos sensibles de ambas zonas (Figura 4).

#### Metalaxyl vs. metalaxyl-M

Todos los aislamientos evaluados que fueron resistentes al metalaxyl también lo fueron al metalaxyl-M (Cuadro 2). Los 5 aislamientos sensibles al metalaxyl usados como una referencia de sensibilidad, también fueron sensibles al metalaxyl-M (Cuadro 2). Si bien todos los aislamientos evaluados en este estudio mantuvieron su nivel de resistencia para ambos fungicidas, la  $CE_{50}$  y su distribución fueron diferentes (Figura 5). La mayoría de los aislamientos resistentes (92%) tuvo una  $CE_{50}$  mayor para la mezcla racémica (metalaxyl) que para el isómero activo puro (metalaxyl-M). El valor de la  $CE_{50}$  varió de 370 a 1527  $\mu\text{g/ml}$  para el metalaxyl y de 76 a 698  $\mu\text{g/ml}$  para el metalaxyl-M. Sin embargo, no hubo una alta relación entre los valores de las  $CE_{50}$  ( $r^2=0.49$ ).

Los valores de la  $CE_{50}$  en el metalaxyl parecieran tener una distribución normal ( $P=0.75$ ) mientras que los valores de la  $CE_{50}$

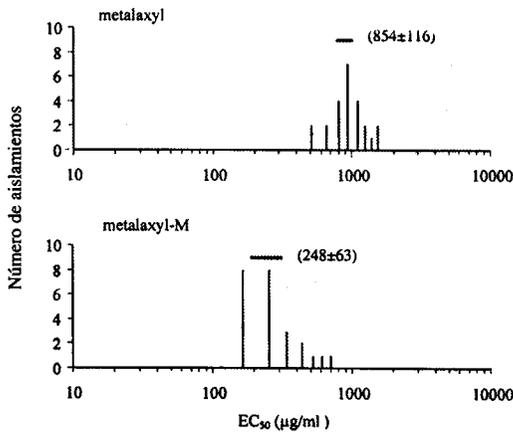


Fig. 5. Valores de la  $CE_{50}$  de 24 aislamientos de *Phytophthora infestans* resistentes a la mezcla racémica metalaxyl y a su enantiómero activo metalaxyl-M. Número entre parentesis y barras horizontales = promedio  $\pm$  IC (IC = intervalo de confianza =  $x \pm t_{\omega_2} ee$ ).

en el metalaxyl-M no tienen esta distribución ( $P=0.09$ ). En este último caso 2/3 de los aislamientos resistentes muestran una  $CE_{50}$  baja (Figura 5).

## DISCUSION

En América Central, se conoce poco acerca de la resistencia de *P. infestans* al metalaxyl y en general sobre su estructura poblacional. Este es el primer estudio en Costa Rica que contempla la caracterización de un gran número de aislamientos. Estudios previos realizados por Hohl e Iselin (1984), Goodwin et al. (1994) y Sanchez et al.

(2000), incluyen un número limitado de aislamientos procedentes de Costa Rica.

Durante este estudio, evaluando el crecimiento radial del micelio para determinar la resistencia al metalaxyl, sólo se encontraron aislamientos resistentes y sensitivos (Cuadro 1, Figura 2). Aunque algunos autores señalan que las metodologías *in vivo* reflejan mejor la situación en el campo (Sozzi et al. 1992), la metodología *in vitro* ha sido consistente con la prueba *in vivo* usando discos de hojas (Fraser et al. 1999) y también ha sido confirmada en experimentos de campo (Goodwin et al. 1996). Una evaluación simultánea del análisis *in vitro* y el análisis *in vivo* mostró una  $r^2$  superior a 0.94 (Matuszak et al. 1994). En otros trabajos como el de Lee et al. (1999), la metodología *in vivo* del disco de la hoja fue muy problemática para determinar la sensibilidad al metalaxyl, mientras que la prueba *in vitro*, mostró mayor consistencia. La prueba *in vitro*, sin embargo, esporádicamente puede dar resultados inconsistentes en aislamientos con una tasa de crecimiento baja (Goodwin et al. 1996). En este estudio, la presencia de algunos aislamientos con tasa de crecimiento baja, no impidió determinar la resistencia del patógeno al fungicida. El criterio de Therrien et al. (1993) y Fraser et al. (1999) para determinar el nivel de resistencia, el cual es usado de manera estándar, fue muy consistente con los valores de la  $CE_{50}$  de los aislamientos. Entre los aislamientos que fueron evaluados tanto para el nivel de resistencia como para la  $CE_{50}$  ( $n=93$ ), todos aquellos con nivel de resistencia sensible mostraron una  $CE_{50}$  entre 0.01 y 0.3 mg/ml mientras que los resistentes mostraron una  $CE_{50}$  entre 370 y 2350 mg/ml. Estos

Cuadro 2. Nivel de resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* a la mezcla racémica metalaxyl y a su enantiómero activo metalaxyl-M.

Metalaxyl \ Metalaxyl-M	Resistentes*	Intermedios	Sensibles	Total
Resistentes	24	0	0	24
Intermedios	0	0	0	0
Sensibles	0	0	5	5
Total	24	0	5	29

\* Nivel de resistencia de acuerdo a Fraser et al. (1999).

valores de  $CE_{50}$  son similares, respectivamente, a los valores de  $CE_{50}$  de otros aislamientos de *P. infestans* sensibles y resistentes (Koh et al. 1994, Sujkowski et al. 1995, Fraser et al. 1999, Liguori et al. 2000) y también similares a otros aislamientos sensibles y resistentes de diferentes especies de *Phytophthora* (Fisher y Hayes 1982, 1985, Matheron y Porchas 2000, Liguori et al. 2000).

Dosis bajas de metalaxyl estimularon el crecimiento de algunos aislamientos (datos no mostrados). Aproximadamente, la mitad de los aislamientos resistentes evaluados para la  $CE_{50}$  mostraron hasta un 15% de incremento en su crecimiento en las dosis de 0.001-1.0 mg/ml con relación al control. Este resultado, aunque no es ampliamente discutido, se puede inferir de las figuras presentadas en otras investigaciones (Goodwin et al. 1996, Forbes et al. 1997, Lamour y Hausbeck 2000). Aunque las bases de la estimulación del crecimiento por el metalaxyl son desconocidas, algunos investigadores proponen un modelo de interacción molecular entre el metalaxyl y la ARN-polimerasa. En los aislamientos resistentes hay una alteración en la ARN-polimerasa, de tal forma que el metalaxyl podría unirse a la enzima aumentando su actividad y por consiguiente estimulando el crecimiento (Zhang et al. 1997). Este modelo sería aplicable únicamente a los aislamientos resistentes, y en este estudio, en las dosis de 0.001-0.01 también se observó un estímulo del crecimiento hasta de un 17% en un 1/3 de los aislamientos sensibles evaluados para la  $CE_{50}$ . Este resultado indica que el estímulo del crecimiento por el metalaxyl podría ser más complejo de lo que proponen Zhang et al. (1997).

Con respecto a la resistencia de *P. infestans* al metalaxyl en papa, se obtuvo una población resistente y otra sensible. Esto podría ser considerado como un patrón de resistencia bimodal, originado a partir de una población sensitiva inicial donde el metalaxyl actúa como un factor de selección (Goodwin et al. 1996). En este tipo de resistencia, denominada también resistencia cualitativa, discontinua, discreta, de un solo paso o disruptiva, se observa claramente una población del patógeno sensible y otra resistente con una amplia diferencia en su respuesta al fungici-

da (Brent 1995). Se asume que el alelo de resistencia existe en la población inicial antes de la introducción del metalaxyl y el uso de éste selecciona individuos en una población con sensibilidad reducida al fungicida (Daggett et al. 1993). Sin embargo, el presente estudio se llevó a cabo aproximadamente 15 años después de que el metalaxyl se introdujo en Costa Rica, por lo que hay que considerar también los procesos de migración de *P. infestans*, los cuales han sido mencionados como una forma de introducción de aislamientos resistentes de una región a otra, involucrando en el proceso frutos de tomate y tubérculos de papa infectados (Koh et al. 1994, Matuszak et al. 1994, Goodwin et al. 1996, Fraser et al. 1999, Sedegui et al. 2000).

Durante este estudio, se observó una gran diferencia en la frecuencia de aislamientos resistentes entre ambas zonas productoras (Cuadro 1, Figura 3). Esta diferencia podría estar relacionada, principalmente, con el patrón de uso de los fungicidas, ya que el fungicida actúa como el factor de selección de cepas resistentes (Goodwin et al. 1996). Basados en esta situación, la alta frecuencia de aislamientos resistentes encontrada en Zarcero podría ser el resultado de un mayor uso, en esta zona, de productos que contengan fungicidas fenilamidas, probablemente como resultado de una alta presión de la enfermedad. En regiones como Corea (Koh et al. 1994) y Ecuador (Forbes et al. 1997) el patrón de uso del metalaxyl también ha sido considerado responsable de la distribución regional de los aislamientos resistentes. Sin embargo, en otras regiones como Carolina del Norte (Fraser et al. 1999) no se ha encontrado diferencias en la frecuencia de aislamientos resistentes entre campos aplicados y no aplicados con metalaxyl. Esta última situación, muestra como la frecuencia de aislamientos resistentes, una vez seleccionada la resistencia, no solo depende del uso del fungicida sino también de la capacidad adaptativa que tengan los individuos resistentes. En este sentido, algunos trabajos han mostrado que los aislamientos de *P. infestans* resistentes al metalaxyl son igualmente o más agresivos y adaptados que los aislamientos sensibles (Gisi y Cohen 1996). Otras experiencias demuestran que la frecuencia de los aislamientos

resistentes al metalaxyl disminuye en ausencia de la presión de selección (Staub 1991), indicando que la resistencia en una población es un proceso reversible.

Es difícil predecir qué pudo provocar esta diferencia en Costa Rica, ya que no existe documentación clara sobre el uso de fungicidas para el control del tizón tardío. Pensar entonces que la alta frecuencia de aislamientos resistentes encontrada en la zona de Zarcero fue debida a que los individuos resistentes poseen una mayor agresividad patogénica y sean mejor adaptados, es una conclusión anticipada. Un estudio reciente, realizado por Lee et al. (1997) mostró como la resistencia al metalaxyl y la agresividad patogénica son 2 características que no están relacionadas genéticamente. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios que permitan observar la agresividad de los aislamientos resistentes y sensibles sobre las variedades de papa cultivadas en el país, y de esta manera, determinar las posibles implicaciones del factor de resistencia en la epidemiología del tizón tardío en papa.

Una observación importante de este estudio, fue que la diferencia en la frecuencia de aislamientos resistentes y sensitivos en cada zona no mostró cambio aparente durante los períodos de muestreo (Figura 3). Resultados similares obtuvieron Matuszak et al. (1994) en México, cuando analizaron un solo campo no tratado con metalaxyl, durante una epidemia de tizón tardío (período de muestreo de 40 días) o en un sitio (Banco-Metapec) de un año a otro. Sin embargo, en otros lugares se han documentado cambios en la frecuencia de los aislamientos resistentes de un año a otro o en cortos períodos de tiempo durante varios años, lo cual también fue relacionado con el uso del metalaxyl (Bradshaw y Vaughan 1996, Daayf y Platt 1999).

### Metalaxyl vs. metalaxyl-M

Todos los aislamientos resistentes al metalaxyl evaluados en la segunda parte de este trabajo, también fueron resistentes al metalaxyl-M. El fungicida metalaxyl es una mezcla racémica que consta de 2 isómeros, el enantiómero R con rotación óptica negativa (-) y el enantiómero S con rotación óptica positiva (+) (Nuninger et al.

1996). El enantiómero R es el isómero con mayor actividad fungicida de la mezcla racémica y fue purificado como metalaxyl-M (Fisher y Hayes 1985, Nuninger et al. 1996, Liguori et al. 2000). Esta nueva síntesis del isómero más activo, también es conocida como mefanoxan (Parra y Ristaino 1998, Groves y Champaco 2000, Lamour y Hausbeck 2000). Se ha propuesto que el uso del metalaxyl-M en lugar del metalaxyl podría ofrecer ventajas ambientales y toxicológicas al disminuir la cantidad de producto aplicado y ofrecer una mayor actividad contra patógenos oomicetes, sin afectar la selección de cepas resistentes (Nuninger et al. 1996, Cooke y Deahl 1998, Liguori et al. 2000). Sin embargo, el mecanismo de resistencia hacia el metalaxyl está estrictamente relacionado con su modo de acción, más aún la resistencia cruzada es común entre los fungicidas fenilamidas (Davidse 1995, Nuninger et al. 1996).

En otros estudios, la resistencia de *P. infestans* al fungicida metalaxyl-M también ha sido reportada (Groves y Chapanco 2000), en adición, el comportamiento de ambos fungicidas ha sido evaluado en otras especies de *Phytophthora* y *Peronospora*. Parra y Ristaino (1998) encontraron que aislamientos de *P. capsici* resistentes al metalaxyl, recolectados en chile dulce (*Capsicum annuum* L.), también fueron resistentes al metalaxyl-M. Resultados similares encontraron Vishunavat et al. (1998) al evaluar el efecto del metalaxyl y el metalaxyl-M en aislamientos de *Peronospora parasitica* recolectados de *Brassica* spp. De igual forma, Lamour y Hausbeck (2000) encontraron aislamientos de *P. capsici* resistentes al metalaxyl-M, provenientes de chile dulce, melón (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) y calabaza (*Cucurbita* spp.).

Ha sido documentado que en aislamientos sensibles la  $CE_{50}$  del metalaxyl es mayor que la del metalaxyl-M, ya que este último posee el isómero con mayor actividad fungicida (Fisher y Hayes 1985, Liguori et al. 2000). Este mismo comportamiento fue observado en el presente estudio para aislamientos resistentes (Figura 5). Sin embargo, no hubo una alta relación entre los valores de las  $CE_{50}$  ( $r^2=0.49$ ), es decir, que aislamientos resistentes con una  $CE_{50}$  similar para el

metalaxyl pueden mostrar una  $CE_{50}$  diferente para el metalaxyl-M. Esta baja relación podría ser objeto de una interacción no muy sencilla en la forma en que se confiere la resistencia del patógeno hacia una mezcla racémica y hacia su isómero activo puro. Trabajos de genética clásica han mostrado que la resistencia de *Phytophthora* a fungicidas fenilamidas parece estar regulada por un solo gen con dominancia incompleta (Shattock 1988, Lamour y Hausbeck 2000). Otros trabajos en genética molecular, han propuesto que la resistencia a fenilamidas es un mecanismo genético más complejo, involucrando tanto genes mayores como menores (Fabritius et al. 1997, Judelson y Roberts 1999). Por otro lado, Lee et al. (1999) proponen que la resistencia de *P. infestans* al metalaxyl es controlada por un solo gen dominante modificado por otros genes con efectos menores.

Los resultados obtenidos en este estudio son parte de una línea base para la evaluación de la ocurrencia de aislamientos de *P. infestans* resistentes al metalaxyl en el cultivo de papa en Costa Rica y pueden ser utilizados para monitorear cambios en la resistencia al metalaxyl en los próximos años. Además, estos resultados pueden ser usados para desarrollar un programa antiresistencia que ayude a un manejo integrado de la enfermedad. De ser así, las estrategias podrían incluir una fuerte información sobre el uso de fungicidas y, debido a la alta frecuencia de aislamientos resistentes en la zona de Zarcero, podría suspenderse el uso de productos fenilamidas en esta zona, ya que el uso de mezclas de fungicidas fenilamidas con fungicidas protectores parece ser una estrategia insuficiente para disminuir la resistencia (Doster et al. 1990). Esta estrategia de suspender el uso de productos fenilamidas, se ha llevado a cabo en otros lugares con alta frecuencia de aislamientos resistentes, y luego de varios años, han sido introducidos de nuevo con un uso limitado, manteniendo la resistencia en un estado manejable (Erwin y Ribeiro 1996). Por otro lado, algunas regiones han recomendado no usar fungicidas fenilamidas en campos para la producción de semilla de papa, debido a que el inóculo resistente en la semilla puede ser fuente de diseminación de cepas resistentes (Erwin y Ribeiro 1996). El uso li-

mitado de productos fenilamidas debe ir acompañado de otras estrategias de control que ayuden a un manejo integrado de la enfermedad.

Como una medida adicional para entender mejor la resistencia y el comportamiento de las poblaciones de *P. infestans*, se está evaluando una serie de estos aislamientos, resistentes y sensibles, para conocer su agresividad patogénica, tipo de apareamiento, razas y su variación genética en general.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Comisión Europea a través del proyecto INCO-DC: "Exploitation of the genetic biodiversity of wild relatives for breeding potatoes with sustainable resistance to late blight (*Phytophthora infestans*)".

## LITERATURA CITADA

- BASHAN B., KADISH D., LEVY Y., COHEN Y. 1989. Infectivity to potato, sporangial germination, and respiration of isolates of *Phytophthora infestans* from metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant populations. *Phytopathology* 79:832-836.
- BRADSHAW N.J., VAUGHAN T.B. 1996. The effect of phenylamide fungicides on the control of potato late-blight (*Phytophthora infestans*) in England and Wales from 1978 to 1992. *Plant Pathology* 45: 249-269.
- BRENT K. 1995. Fungicides-resistance in crop pathogens: How can it be managed?. Global Crop Protection Federation. Brussels, Belgium. FRAC Monograph N° 1. 48 p.
- CATEN C.E., JINKS J.L. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. *Canadian Journal of Botany* 46:329-348.
- COOKE L.R., DEAHL K.L. 1998. Potato blight—Global changes and new problems. *Pesticide Outlook* 12:22-28.
- DAAYF F., PLATT H.W. 1999. Assessment of mating type and resistance to metalaxyl of Canadian populations of *Phytophthora infestans* in 1997. *American Journal of Potato Research* 76:287-295.
- DAGGETT S.S., GÖTZ E., THERRIEN C.D. 1993. Phenotypic changes in populations of *Phytophthora*

- infestans* from Eastern Germany. *Phytopathology* 83:319-323.
- DAVIDSE L.C. 1995. Phenylamides-Biochemical action and resistance. 347-354. *In: Modern selective fungicides- properties, applications, mechanisms of action.* Ed. by Lyr, H. Gustav Fischer Verlag. 595 p.
- DAVIDSE L.C., HOFMAN A.E., VELTHUIS G.C.M. 1983. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Experimental Mycology* 7:344-361.
- DOSTER M.A., MILGROOM M.G., FRY W.E. 1990. Quantification of factors influencing potato late blight suppression and selection for metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*: A simulation approach. *Phytopathology* 80:1190-1198.
- ERWIN D.C., RIBEIRO O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS PRESS. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- FABRITIUS A.L., SHATTOCK R.C., JUDELSON H.S. 1997. Genetic of metalaxyl insensitivity loci in *Phytophthora infestans* using linked DNA markers. *Phytopathology* 87:1034-1040.
- FISHER D.J., HAYES A.L. 1982. Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. *Pesticide Science* 13:330-339.
- FISHER D.J., HAYES A.L. 1985. A comparison of the biochemical and physiological effects of the systemic fungicide cyprofuram with those of the related compounds metalaxyl and metolachlor. *Crop Protection* 4:501-510.
- FORBES G.A., ESCOBAR X.C., AYALA C.C., REVELO J., ORDOÑEZ M.M., FRY B.A., DOUCETT K., FRY W.E. 1997. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* 87:375-380.
- FORBES G.A., GOODWIN S.B., DRENTH A., OYARZUN P., ORDOÑEZ M.A., FRY W.E. 1998. A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 82:811-818.
- FRASER D.E., SHOEMAKER P.B., RISTAINO J.B. 1999. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from tomato and potato in North Carolina from 1993 to 1995. *Plant Disease* 83:633-638.
- FRY W.E., SPIELMAN L.J. 1991. Population biology. 171-192. *In: Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato.* Ed. by Ingram, D.S., Williams, P.H. Academic Press. *Advances in Plant Pathology*, Vol. 7. 273 p.
- FRY W.E., GOODWIN S.B., DYER A.T., MATUSZAK J.M., DRENTH A., TOOLEY P.W., SUJKOWSKI L.S., KOH Y.J., COHEN B.A., SPIELMAN L.J., DEAHL K.L., INGLIS D.A., SANDIAN K.P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology pathways, and implications. *Plant Disease* 77:653-661.
- FRY W.E., GOODWIN S.B. 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience* 47:363-371.
- GISI U., COHEN Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology* 34:549-572.
- GOODWIN S.B., SPIELMAN L.J., MATUSZAK J.M., BERGERON S.N., FRY W.E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* in Northern and Central Mexico. *Phytopathology* 82:955-961.
- GOODWIN S.B., COHEN B.A., FRY W.E. 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academic Sciences (USA)* 91:11591-11595.
- GOODWIN S.B., SUJKOWSKI L.S., FRY W.E. 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathology* 86:793-800.
- GROVES C.L., CHAMPACO E.R. 2000. Characterization of *Phytophthora infestans* field isolate of Maine. *Phytopathology* 90(6):S31.
- HOHL H.R., ISELIN K. 1984. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. *Transactions of British Mycological Society* 83:529-530.
- JUDELSON H.S., ROBERTS S. 1999. Multiple loci determining insensitivity to phenylamide fungicides in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 89:754-760.
- KADISH D., COHEN Y. 1988a. Competition between metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in the absence of metalaxyl. *Plant Pathology* 37:558-564.
- KADISH D., COHEN Y. 1988b. Fitness of *Phytophthora infestans* isolates from metalaxyl-sensitive and -resistant populations. *Phytopathology* 78:912-915.
- KOH Y.J., GOODWIN S.B., DYER A.T., COHEN B.A., OGOSHI A., SATO N., FRY W.E. 1994. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans*

- populations in East Asian countries. *Phytopathology* 84:922-927.
- LAMOUR K.H., HAUSBECK M.K. 2000. Mefanoxan insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* 90:396-400.
- LEE T.Y., MIZUBUTI E., FRAY W.E. 1999. Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* 26:118-130.
- LIGUORI R., BERTONA A., COLNAGHI M. 2000. Metalaxyl-M (Ridomil Gold) per la difesa delle colture dalle peronosporacee. *Informatore Fitopatologico* 5:26-32.
- MATHERON M.E., PORCHAS M. 2000. Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-AI, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. *Plant Disease* 84:454-458.
- MATUSZAK J.M., FERNANDEZ-ELQUEZABAL J., GU W.K., VILLARREAL-GONZALEZ M., FRY W.E. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: Distribution and dynamics. *Plant Disease* 78:911-916.
- NEIDERHAUSER J. 1999. Late blight: A threat to global food security. *In: Proceedings of the global initiative on late blight conference*. Ed. by Crissman, L., Lizarraga, C. 157 p.
- NUNINGER G., WATSON G., LEADBITTER N., ELLGEMER H. 1996. CGA329351: Introduction of the enantiomeric form of the fungicide metalaxyl. Brighton Crop Protection Conference -Pests and Diseases 1:41-46.
- PARRA G., RISTAINO J. 1998. Insensitivity to Ridomil Gold (mefanoxan) found among field isolates of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight on bell pepper in North Carolina and New Jersey. *Plant Disease* 82:711.
- SANCHEZ V., SHATTOCK R.C., BUSTAMANTE E. 2000. Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* nativos de Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (CR)* 55:36-42.
- SCHWINN F., STAUB T. 1995. Phenylamides and other fungicides against *Oomycetes*. *In: Modern selective fungicides - properties, applications, mechanisms of action*. Ed. by Lyr, H. Gustav Fischer Verlag. 595 p.
- SEDEGUI M., CARROLL R.B., MOREHART A.L., EVANS T.A., KIM S.H., LAKHDAR R., ARIFI A. 2000. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. *Plant Disease* 84:173-176.
- SHATTOCK, R.C. 1988. Studies of the inheritance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 37:4-11.
- SOZZI D., SCHWINN F.J., GISI U. 1992. Determination of the sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamides: a leaf disc method. *EPPO Bulletin* 22:306-309.
- STAUB T. 1991. Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology* 29:421-442.
- SUJKOWSKI L.S., FRY B.A., POWER R.J., GOODWIN S.B., PEEVER T.L., HAMLIN R.A., FRY W.E. 1995. Sensitivities of mexican isolates of the *Phytophthora infestans* to chlorothalonil, cymoxanil, and metalaxyl. *Plant Disease* 79: 1117-1120.
- THERRIEN, C.D., TOOLEY P.W., SPIELMAN L.J., FRY W.E., RITCH D.L., SHELLY S.E. 1993. Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* from Japan. *Mycological Research* 97: 945-950.
- TOOLEY P.W., FRY W.E., VILLARREAL-GONZALEZ M.J. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *The Journal of Heredity* 76:431-435.
- URECH P.A., SCHWINN F., STAUB T. 1977. CGA 48988, a novel fungicide for the control of late blight, downy mildews, and related soil-borne disease. *Proceedings British Crop Protection Conference*, p. 623-631.
- VISHUNAVAT, K., NASHAAT N.I., HERAN A., KOLTE S.J. 1998. Sensitivity to the racemic mixture and isomeric forms of metalaxyl in Indian and European homothallic and heterothallic isolates of *Peronospora parasitica* in *Brassica* species. *Crop Protection* 17(6):543-546.
- ZHANG S., PANACCIONE D.G., GALLEGLY M.E. 1997. Metalaxyl stimulation of growth of isolates of *Phytophthora infestans*. *Mycologia* 89(2):289-292.