

Análisis de la Sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Banano a los Fungicidas Benomyl, Propiconazol y Azoxistrobin

Sensitivity Analysis *in vitro* of *Mycosphaerella fijiensis*, Causal Agent of Black Sigatoka of Banana to the Fungicides Benomyl, Propiconazole and Azoxystrobin

Gilberto Manzo Sánchez, Heriberto Carrillo Madrigal, Salvador Guzmán González, Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Laboratorio de Biotecnología, Apdo. Postal 36, Autopista Colima-Manzanillo km 40, Tecomán, Col., CP 28100, México; **Mario Orozco Santos**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Tecomán. Apdo Postal 88, Tecomán, Col., CP 28100, México. Correspondencia: gilberto_manzo@yahoo.com

(Recibido: Junio 07, 2010 Aceptado: Septiembre 02, 2011)

Manzo SG, Carrillo MH, Guzmán GS y Orozco SM. 2012. Análisis de la sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra del banano a los fungicidas benomyl, propiconazol y azoxistrobin. Revista Mexicana de Fitopatología 30:81-85.

Resumen. Los aislados fueron obtenidos de las regiones productoras de banano de *Mycosphaerella fijiensis* pertenecientes a los estados de Chiapas, Tabasco, Michoacán, Colima y Guerrero. Los fungicidas evaluados fueron benomyl, propiconazol y azoxistrobin. Por otra parte, el análisis de sensibilidad a los fungicidas presentó la pérdida de sensibilidad de 10 aislados a benomyl, siete a propiconazol y nueve a azoxistrobin. Dichos aislados fueron capaces de crecer a las concentraciones que indican la pérdida de sensibilidad. De acuerdo con los resultados de esta investigación, es importante acatar las recomendaciones para el uso de los fungicidas a fin de evitar fallas en el control de la enfermedad. En el caso del benomyl, su uso deberá ser restringido en las localidades que presentaron aislados resistentes.

Palabras clave adicionales: Control químico, *Musa*, pérdida de sensibilidad.

La Sigatoka negra cuyo agente causal es el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, enfermedad que provoca mayor impacto, debido a la alta demanda de uso de fungicidas necesarios para contrarrestar sus efectos y producir fruta de calidad para exportación (Orozco, 1998; Marín *et al.*, 2003). Esta enfermedad provoca un deterioro paulatino del área foliar, que progresa hacia el desarrollo de una fuerte necrosis (Manzo *et al.*, 2005). Para el control de la enfermedad los fungicidas usados en aplicaciones aéreas son: triazoles (propiconazol, tebuconazol y bitertanol), morfolinas

Abstract. The isolates were obtained from the banana-producing regions *Mycosphaerella fijiensis* belonging to Chiapas, Tabasco, Michoacan, Colima and Guerrero states. The fungicides evaluated were benomyl, propiconazole and azoxystrobin. The susceptibility analysis showed the loss of fungicide susceptibility of 10 isolates to benomyl, seven to propiconazole and nine to azoxystrobin. These isolates were able to grow with fungicide concentration that highlights the loss of sensitivity. According to the results of this research, it is important to respect the recommendations for the use of fungicides to avoid failures in the control of the disease. In the case of benomyl, its use should be restricted in locations that had resistant isolates.

Additional Keywords: chemical control, *Musa*, sensibility loss.

Résumé. Des isolats de *Micospharella fijiensis*, l'agent causal de la cercosporiose noire ont été obtenus à partir des régions productrices de bananes appartenant aux États de Chiapas, Tabasco, Michoacán, Colima et Guerrero. Les fungicides testés étaient le benomyl, le propiconazole et l'azoxistrobine. L'analyse a montré la perte de sensibilité aux fungicides de dix isolats pour le benomyl, sept pour le propiconazole et neuf pour l'azoxystrobine. Ces isolats ont été capables de pousser en présence de concentrations en fungicides suffisantes à démontrer leur perte de sensibilité. D'après les résultats, il est important de suivre les recommandations pour l'utilisation des fungicides, afin d'éviter les complications dans le contrôle de la maladie. Dans le cas du benomyl, son utilisation devrait être réduite dans les zones qui ont présenté des isolats résistants.

Mots-clés supplémentaires: contrôle chimique, *Musa*, perte de sensibilité.

(tridemorf), benzimidazoles (benomyl) y estrobirulinas (azoxistrobin y trifloxistrobin) (Marín *et al.*, 2003). Para llevar a cabo un manejo de riesgos de evitar la resistencia del patógeno a fungicidas, se ha implementado el uso de estrategias donde se involucra la alternancia de los fungicidas (Orozco, 1998; Romero y Sutton, 1997; FRAC, 2008). Desde hace algunos años se ha detectado la pérdida de sensibilidad de *M. fijiensis* a carbendazim y benomyl (Fullerton y Tracey, 1984; Romero y Sutton, 1997); incluso se ha demostrado que la resistencia a benomyl persiste aún después de que cesan las aplicaciones por períodos de tres a cinco años (Romero y Sutton, 1997). Igualmente ha sido señalada la resistencia a propiconazol (Romero y Sutton, 1998) y azoxistrobin (Chin *et al.*, 2001). Cabe indicar que la evaluación de sensibilidad a fungicidas es importante para la elaboración de sistemas de preaviso, que permitan alertar a los productores sobre las necesidades de suspender o no la aplicación de un determinado fungicida. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue analizar la sensibilidad *in vitro* de aislados de *M. fijiensis* a los fungicidas benomyl, propiconazol y azoxystrobin. Para el análisis de la sensibilidad de los fungicidas fueron seleccionadas 11 aislados de *M. fijiensis* de los estados de Colima, Michoacán, Guerrero, Tabasco y Chiapas. Los fungicidas usados fueron los siguientes: propiconazole (Tilt®, Syngenta), benomyl (Benlate®, E. I. DuPont de Nemours) y azoxystrobin (Bankit®, Syngenta). Las soluciones stock de los fungicidas fueron preparadas diluyendo una solución concentrada de 1 g L⁻¹. Se utilizaron 0.3, 1, 5 y 10 ppm de i.a. de benomyl (Romero y Sutton, 1997; FRAC, 2008), 0.003, 0.01, 0.1, 1 y 3 ppm de i.a. de propiconazol (Romero y Sutton, 1998) y 0.1, 3 y 10 de azoxistrobin (Sierotzki *et al.*, 2000). Las concentraciones se adicionaron al medio PDA (por calor húmedo a 121°C durante 15 min), el cual fue vaciado en cajas Petri, donde posteriormente se colocaron las colonias monospóricas, con un diámetro de 0.1 mm aproximadamente y de cuatro a cinco días de crecimiento. Se utilizaron como testigo cajas Petri con PDA sin fungicida. La sensibilidad de cada uno de los aislados de *M. fijiensis* se determinan con base en el crecimiento basal de las colonias, midiendo el diámetro de las mismas con ayuda de un microscopio (Olympus CH300) adaptado un micrometro, las lecturas se hicieron tomando el día cero y a los siete días después del cultivo (Romero y Sutton, 1998). Los tratamientos se evaluaron de forma separada, es decir, por fungicida bajo un diseño factorial (factor A, aislados del hongo y factor B, concentraciones de fungicidas) con arreglo combinatorio y distribución completamente al azar. Para cada concentración de fungicida se emplearon cuatro repeticiones. La unidad experimental fue una caja Petri con cinco colonias monospóricas. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey al 0.05 de probabilidad, empleando el paquete estadístico SAS (SAS, 1998). La sensibilidad a los fungicidas indica la dosis sobre la cual no debe de existir crecimiento del hongo en condiciones *in vitro*, de ocurrir crecimiento alguno, se reconoce que existe resistencia del patógeno hacia el fungicida (FRAC, 2008; Romero y Sutton, 1997; Romero y Sutton, 1998; Sierotzki *et al.*,

Black Sigatoka, whose causal agent is the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, disease that causes a great impact, due to the high demand of use of fungicides to counteract its effects in order to produce export-quality fruit (Orozco, 1998; Marín *et al.*, 2003). This disease causes a gradual deterioration of the leaf area, that progresses into the development of a strong necrosis (Manzo *et al.*, 2005). To control the disease, the fungicides used in aerial applications are: triazoles (propiconazole, tebuconazole and bitertanol), morpholines (tridemorph), benzimidazoles (benomyl) and strobilurins (azoxystrobin and trifloxystrobin) (Marín *et al.*, 2003). To carry out a risk management program to prevent pathogen resistance to fungicides, the use of strategies involving the alternation of fungicides were implemented (Orozco, 1998; Romero and Sutton, 1997; FRAC, 2008). In recent years, decreased sensitivity of *M. fijiensis* to carbendazim and benomyl has been detected (Fullerton and Tracey, 1984; Romero and Sutton, 1997); it has been demonstrated that the resistance to benomyl persists even after the cessation of applications for periods of three to five years (Romero and Sutton, 1997). Resistance to propiconazole (Romero and Sutton, 1998) and azoxystrobin (Chin *et al.*, 2001) have also been reported. It should be noted that the evaluation of sensitivity to fungicides is important for the development of warning systems, that allow to warn the producers of the need to stop or not the application of a certain fungicide. Therefore, the objective of the present study was to analyze the *in vitro* sensitivity of *M. fijiensis* isolates to the fungicides benomyl, propiconazole and azoxystrobin. Eleven isolates of *M. fijiensis* were selected for the fungicide sensitivity analysis from the states of Colima, Michoacan, Guerrero, Tabasco and Chiapas. The fungicides used were the following: propiconazole (Tilt®, Syngenta), benomyl (Benlate®, DuPont) and azoxystrobin (Bankit®, Syngenta). The stock solutions were prepared by diluting a concentrated solution of 1 g L⁻¹ of fungicide. 0.3, 1, 5 and 10 ppm were used of the a.i. benomyl (Romero and Sutton, 1997; FRAC, 2008), 0.003, 0.01, 0.1, 1 and 3 ppm of a.i. propiconazole (Romero and Sutton, 1998) and 0.1, 3 and 10 ppm of a.i. azoxystrobin (Sierotzki *et al.*, 2000). The concentrations were added to PDA medium (by moist heat at 121°C during 15 min), which was poured into Petri dishes where the monosporic colonies were later placed, with a diameter of approximately 0.1 mm and from four to five days of growth. Petri dishes with PDA without fungicide were used as control. The sensitivity of each one of the isolates of *M. fijiensis* was determined based on the basal growth of the colonies, measuring their diameter with the aid of a microscope (Olympus CH300) with an adapted micrometer, the readings were taken from day zero and at seven days after culture (Romero and Sutton, 1998). The treatments were evaluated separately, *ie* by fungicide under a factorial design (factor A, isolates of the fungi and factor B, concentrations of the fungicides) with a combinatorial design and completely random distribution. Four replications were used for each concentration of every fungicide.

The experimental unit was a Petri dish with five monosporic colonies. The obtained data was submitted to

2000).

Para el caso de benomyl se determinó que 10 aislados mostraron resistencia al fungicida (Cuadro 1), ya que fueron capaces de crecer a la dosis de 10 ppm. Existen reportes en donde se ha detectado la pérdida de sensibilidad a benomyl de algunos aislados de diversos orígenes geográficos, como en las Islas del Pacífico (Fullerton y Tracey, 1984), Costa Rica (Romero y Sutton, 1998) y Colombia (Cañas *et al.*, 2006). En general, los fungicidas de contacto son inhibidores de múltiples sitios de acción y tienen un bajo riesgo de desarrollar resistencia. Pero el uso continuo e indiscriminado de este tipo de fungicidas sin rotación o alternancia con otros tipos de fungicidas podría desarrollar resistencia al hongo. La mayoría de las localidades muestreadas tienen un historial de aplicaciones de benomyl, pero en algunos casos, este fungicida ya no es utilizado para el control de Sigatoka negra. Sin embargo, se ha determinado que la resistencia a benomyl persiste aún después de que cesan las aplicaciones del fungicida por períodos de tres a cinco años (Romero y Sutton, 1998). En cambio, en el caso de propiconazol, se determinó que siete aislados crecieron a la dosis de 1 ppm, lo cual representa la pérdida de sensibilidad del hongo hacia este fungicida. En comparación sobre previos estudios, se ha determinado que *M. fijiensis* muestra resistencia a propiconazole, por ejemplo en aislados de Costa Rica (Romero y Sutton, 1997) y Colombia (Cañas *et al.*, 2006). Por último, para el caso del fungicida azoxystrobin nueve aislados crecieron a la dosis de 3 ppm, en cambio algunos autores mencionan la pérdida de sensibilidad en Costa Rica (Sierotzki *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 2001) y Cuba (Peláez *et al.*, 2006). Es importante hacer

ANOVA and Tukey mean test at 0.05 of probability, using the SAS statistical package (SAS, 1998). The sensibility to the fungicides indicates the doses above which growth of the fungi should not exist under *in vitro* conditions, should any growth occur, it is recognized that there is resistance of the pathogen to the fungicide (FRAC, 2008; Romero and Sutton, 1997; Romero and Sutton, 1998; Sierotzki *et al.*, 2000).

In the case of benomyl, it was determined that ten isolates showed resistance to the fungicide (Table 1), as they were able to grow at a dose of 10 ppm. There are reports where a loss of sensitivity to benomyl has been detected in some isolates from different geographical origins, as in the Pacific Islands (Fullerton and Tracey, 1984), Costa Rica (Romero and Sutton, 1998) and Colombia (Cañas *et al.*, 2006). In general, contact fungicides are inhibitors of multiple sites of action and have a low risk of resistance development. But the continuous and indiscriminate use of this type of fungicides without rotation or alternation with other types of fungicides could cause resistance to develop in the fungi. The majority of the sampled sites have a history of benomyl application, but in some cases this fungicide is not used anymore to control Black Sigatoka. However, it has been determined that the resistance to benomyl persists even three to five years after the cessation of the application of the fungicide (Romero and Sutton, 1998). In contrast, in the case of propiconazole it was determined that seven isolates grew at a dose of 1 ppm, which represents a loss of sensitivity of the fungus to this fungicide. In comparison to previous studies, it has been determined that *M. fijiensis* shows resistance to propiconazole, for example in isolates

Cuadro 1. Diámetro de crecimiento de colonias (µm) de aislados de *Mycosphaerella fijiensis* sobre diferentes concentraciones de benomyl, propiconazole y azoxistrobin.

Table 1. Colony growth diameter (µm) of *Mycosphaerella fijiensis* isolates on different concentrations of benomyl, propiconazole and azoxystrobin.

Estado	Testigo	Concentración del fungicida (ppm)											
		Benomyl				Propiconazole			Azoxistrobin				
		0.3	1.0	5.0	10	0.003	0.01	0.1	1.0	3.0	0.1	3.0	10
Colima	30 ^a	33.5b	27c	39c	0b	0c	0c	0b	0a	0a	18b	0a	0a
Colima	474	75b	195bc	39c	91b	18c	9c	0b	0a	0a	45b	24a	6a
Colima	954	1524a	1599a	1260a	1458a	54c	81c	57b	6a	3a	93ab	48a	36a
Guerrero	180	15b	48b	48c	18b	21c	15c	6b	9a	6a	51b	30a	24a
Colima	576	12b	27c	108c	39b	39c	66c	72b	9a	0a	141ab	27a	21a
Colima	1752	1659a	374a	1487a	18b	54c	33c	9b	21a	0a	66b	102a	33a
Michoacán	492	333b	404b	498b	144b	144c	74c	39b	36a	12a	18b	24a	18a
Michoacán	207	123b	111b	96c	90b	12c	9c	9b	0a	0a	15b	0a	0a
Chiapas	390	278b	171b	306bc	63b	372b	309b	255a	39a	6a	228a	15a	48a
Michoacán	972	330b	375b	606b	21b	27.75c	15c	6b	0a	0a	24b	12a	15a
Tabasco	468	45b	30c	30c	22b	1257a	786a	220ab	24a	0a	60b	15a	27.5a

^aUn micrómetro fue usado para determinar el diámetro de la colonia, la cual fue crecida en medio de PDA embebido con las diferentes concentraciones del fungicida después de siete días a 25°C. Los valores de cada aislado corresponden a la media de cinco colonias por caja de Petri, de un total de cuatro cajas por cada concentración del fungicida.

mención que en previos estudios de sensibilidad, no han encontrado resistencia a benomyl, propiconazol y azoxystrobin (Peláez *et al.*, 2006), esto nos demuestra que haciendo un buen uso de aplicaciones de fungicidas con diferente modo de acción, difícilmente el patógeno presentará resistencia a los fungicidas. Por otra parte, se ha demostrado que los aislados de *M. fijiensis* que presentan resistencia a benomyl, propiconazol y azoxystrobin muestran altos niveles de agresividad sobre plantas de banano, esto en comparación con aislados susceptibles a dichos fungicidas (Romero y Sutton, 1997; Romero y Sutton, 1998; Chin *et al.*, 2001). Por lo tanto, se recomienda intercalar fungicidas con diferente modo de acción y un uso moderado de estos fungicidas. En la última década, se ha implementado el uso de herramientas moleculares para realizar un diagnóstico preciso sobre la caracterización molecular de aislados de *M. fijiensis* resistentes y susceptibles a los fungicidas azoxystrobin (Sierotzki *et al.*, 2000), benomyl (Cañas *et al.*, 2006) y propiconazol (Cañas *et al.*, 2006). Recientemente, se ha realizado un análisis molecular de 44 aislados para determinar su resistencia o sensibilidad a benomyl, demostrando que 24 aislados fueron resistentes. Finalmente, se demuestra que el análisis de sensibilidad *in vitro* de aislados de *M. fijiensis* a los fungicidas benomyl, propiconazol y azoxystrobin, fue eficiente para comprobar los niveles de sensibilidad hacia los fungicidas de aislados de patógeno nativos de diferentes localidades geográficas y con diferente manejo del cultivo. Ya que existieron aislados resistentes y sensibles a los fungicidas analizados, esto concordó con el tipo de manejo del cultivo. Es importante describir algunas recomendaciones generales propuestas por el comité de acción para la resistencia a fungicidas (FRAC) son las siguientes: Para que una mezcla sea efectiva en una estrategia de manejo de resistencia, la dosis de cada componente usado solo debe ser suficiente para proveer control satisfactorio; se debe respetar la dosis recomendada en la etiqueta para cada componente de la mezcla; los fungicidas de contacto se consideran una herramienta valiosa y necesaria en los programas de control de Sigatoka negra en banano; los fungicidas sitio específico se deben aplicar en suspensiones de aceite o en emulsiones aceite agua (FRAC, 2008).

Agradecimientos. Al CONACyT y Gobierno del Estado de Colima por el apoyo otorgado mediante el sistema FOMIX Colima 2008 al proyecto con clave 80966.

LITERATURACITADA

- Cañas GG, Patiño LF, Rodríguez AE and Arango R. 2006. Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. *Journal of Phytopathology* 154:403-409.
- Chin KM, Wirz M and Laird D. 2001. Sensivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Disease* 85:1264-1270.
- FRAC. 2008. Fungicide Resistance Action Committee.
- Fullerton, R.A. and Tracey, G.M. 1984. Tolerance of *Mycosphaerella fijiensis* to benomyl and carbendazim in

from Costa Rica (Romero and Sutton, 1997) and Colombia (Cañas *et al.*, 2006). Lastly, in the case of the fungicide azoxystrobin nine isolates grew in the 3 ppm dosage, whereas some authors mention the loss of sensitivity in Costa Rica (Sierotzki *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 2001) and Cuba (Peláez *et al.*, 2006). It is important to mention that resistance to benomyl, propiconazole and azoxystrobin have not been found in previous studies (Peláez *et al.*, 2006), this shows us that making a good use of applications of fungicides of different modes of action, the pathogen will hardly show resistance to the fungicides. On the other hand, it has been shown that the isolates of *M. fijiensis* that showed resistance to benomyl, propiconazole and azoxystrobin show high levels of aggressiveness on banana plants, this in comparison with isolates susceptible to the fungicides mentioned (Romero and Sutton, 1997; Romero and Sutton, 1998; Chin *et al.*, 2001). Therefore, it is recommended to randomize the use of fungicides with different modes of action as well as to moderate their use. In the last decade, the use of molecular tools have been implemented to realize a precise diagnostic over the molecular characterization of resistant and susceptible isolates of *M. fijiensis* to the fungicides: azoxystrobin (Sierotzki *et al.*, 2000), benomyl (Cañas *et al.*, 2006) and propiconazole (Cañas *et al.*, 2006). Recently, a molecular analysis of 44 isolates was realized to determine their resistance or sensitivity to benomyl, demonstrating that 24 isolates were resistant. Finally, it is demonstrated that the *in vitro* sensitivity analysis of *M. fijiensis* isolates to the fungicides benomyl, propiconazole and azoxystrobin, was efficient in proving the levels of sensitivity of pathogen isolates native to different geographical locations towards the fungicides and with different crop managements. Since there were isolates resistant and sensitive to the analyzed fungicides, this concurred with the type of crop management. It is important to describe some general recommendations proposed by the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), which are as follows: In order for a mixture to be effective in a resistance management strategy, the dosage of every component used must be just sufficient to provide satisfactory control; the recommended dosage on the label should be respected for every component of the mixture; contact fungicides are considered a valuable and necessary tool in the Black Sigatoka of Banana control programs; site-specific fungicides should be applied in suspensions of oil or in oil-water emulsions (FRAC, 2008).

Acknowledgements. To CONACyT and The Government of the State of Colima for the support granted through the FOMIX Colima 2008 system to project number 80966.

- the Pacific Islands. *Tropical Agriculture* 61: 133-136.
- Manzo SG, Guzmán GS, Rodríguez GM, James A y Orozco SM. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:122-131.
- Marín DH, Romero RA, Guzmán M, and Sutton TB. 2003. Black Sigatoka: an increasing threat to banana

- cultivation. *Plant Disease* 87:208-222.
- Orozco SM. 1998. Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo Experimental Tecmán, Colima, México, Folleto Técnico No 1. p. 95.
- Peláez MJE, Vásquez D, Díaz B, Castañeda S, Rodríguez B and Arango I. 2006. Use of a micro tittle plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet. *Revista Facultad Nacional Agrícola de Medellín* 59:3425-3433.
- Romero RR and Sutton TB. 1997. Sensivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of bananas to propiconazol. *Phytopathology* 87: 96-100.
- Romero RR and Sutton TB. 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black Sigatoka of banana in Costa Rica. *Plant Disease* 82: 931-934.
- SAS Institute, Inc., 1998. SAS/STAT User's Guide, release 6.10 ed. SAS Institute Inc; Cary, North California.
- Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S and Gisi U. 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the *bc1* enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science* 56:833-841.