

Caracterización Fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su Relación con la Sensibilidad a Fungicidas en Colombia

Phenotypic Characterization of *Mycosphaerella fijiensis* and its Relation with Sensitivity to Fungicides in Colombia

Leonardo Sepúlveda R. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Cra. 72 A No 78 B 141. Medellín, Colombia. Correspondencia: leoxepulveda@gmail.com; lsepulveda@cib.org.co

Recibido: 5 de Agosto, 2015

Aceptado: 18 de Noviembre, 2015

Sepúlveda L. 2015. Caracterización Fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su Relación con la Sensibilidad a Fungicidas en Colombia. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 1-21.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507.8](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507.8)

Primera Publicación DOI: 30 de Noviembre, 2015.

First DOI published: November 30, 2015.

Resumen. El control de *Mycosphaerella fijiensis*, requiere cada vez la aplicación de una mayor cantidad de fungicidas debido a la resistencia que este patógeno ha desarrollado. Se realizó una caracterización fenotípica de aislamientos de *M. fijiensis* en relación a su sensibilidad a los fungicidas piraclostrobin, epoxiconazol y tridemorf esperando complementar los métodos actuales de monitoreo de resistencia. A partir de tejido foliar sintomático recolectado desde 12 fincas bananeras de Colombia durante los años 2013 y 2014, se obtuvo aislamientos monospóricos a los que se les cuantificó la sensibilidad poblacional e individual. Posteriormente esta sensibilidad se comparó con los rasgos fenotípicos que cada aislamiento expresó. Los resultados indicaron que los rasgos asociados con una mayor sensibilidad a piraclostrobin se expresaron en un mayor número de individuos, además se observó la

Abstract. Controlling *Mycosphaerella fijiensis* increasingly requires the use of greater amounts of fungicides due to the resistance this pathogen has developed. A phenotypic characterization of *M. fijiensis* isolates in relation to their sensitivity to fungicides pyraclostrobin, epoxiconazole and tridemorph was carried out, with the intention of complementing existing methods of resistance monitoring. From symptomatic leaf tissue gathered from 12 banana farms in Colombia in 2013 and 2014, monosporic isolates were obtained and their population sensitivity and individual sensitivity were measured. This sensitivity was then compared with phenotypic traits expressed by each isolate. Results indicated that the traits associated with a greater sensitivity to pyraclostrobin were expressed in a greater number of individuals; in addition, the expression of these same features was observed as response to epoxiconazole. For tridemorph, an apparent shared domain was observed among individuals with traits associated to low and high sensitivities. A phenotypic characterization would help find if there are more or fewer individuals tolerant to an active ingredient and to define the time most suitable to apply this active ingredient

expresión de estos mismos rasgos como respuesta a epoxiconazol. Para tridemorf se observó un aparente dominio compartido entre individuos con rasgos asociados a baja y alta sensibilidad. Una caracterización fenotípica permitiría conocer si existe un mayor o menor número de individuos tolerantes a un ingrediente activo y poder definir de esta forma el momento adecuado para aplicar este ingrediente activo sin aumentar la presión de selección sobre estos individuos.

Palabras clave: Piraclostrobin, Epoxiconazol, Tridemorf. Presión de selección. Eficacia biológica.

INTRODUCCIÓN

En Colombia el banano es el tercer recurso agrícola de mayor exportación después del café y las flores, sin embargo estos niveles de exportación son afectados en gran medida por los problemas fitopatológicos (AUGURA, 2015). Entre los patógenos que afectan el banano, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra es considerada la enfermedad más importante y con mayor relevancia a nivel mundial (FRAC, 2014). Y debido a la susceptibilidad de este cultivo a la enfermedad se requiere el uso de múltiples fungicidas a frecuencias relativamente altas con costos estimados en más del 30 % del total de la producción (Churchill, 2011).

En Colombia así como en los demás países exportadores de banano donde se ha reportado a *M. fijiensis*, su control se ha vuelto cada vez más costoso tanto económica como ambientalmente debido a que el número de tratamientos químicos necesarios ha aumentado con el tiempo a causa de la rápida aparición de resistencia a los diferentes fungicidas que han sido empleados (Pérez-Vicente,

without increasing the selection pressure on these individuals

Additional key words: Pyraclostrobin, Epoxiconazole, Tridemorph. Selection pressure. Biological fitness.

INTRODUCTION

In Colombia, the banana tree is the most widely exported crop after coffee and flowers, yet these levels of export are largely affected by plant health problems (AUGURA, 2015). Amongst the pathogens that affect banana plantations, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, the agent that causes black sigatoka, is considered the most important and relevant disease on a global scale (FRAC, 2014). Due to the vulnerability of this crop to the disease, multiple fungicides are required to be used at relatively high frequencies with costs estimated at more than 30 % of the total of the production (Churchill, 2011).

In Colombia, as in all the other banana-exporting countries in which *M. fijiensis* has been reported, its control has come at a great cost, both economically and environmentally, since the necessary number of treatments has increased with time, due to the fast appearance of resistance to the different fungicides that have been used (Pérez-Vicente, 2006; de Bellaire *et al.*, 2010; FRAC, 2014).

Despite the resistance to fungicides is one of the main limitations in the control of this disease, it is worth noting that resistance is a direct cause of the application of fungicides, and is therefore inevitable (Grimmer *et al.*, 2015). However, its intensity and impact on the final production costs can be controlled, and for this purpose, the most useful tool is considered to be a continuous monitoring of the evolution of the resistance, which helps

2006; de Bellaire *et al.*, 2010; FRAC, 2014).

A pesar que la resistencia a fungicidas es uno de los principales limitantes en el control de esta enfermedad se debe tener en cuenta que la resistencia es una causa directa de la misma aplicación de los fungicidas y por lo tanto inevitable (Grimmer *et al.*, 2015), sin embargo su intensidad e impacto sobre los costos finales de producción sí pueden ser controlados y para este fin se ha considerado que la herramienta más útil es implementar un monitoreo continuo de la evolución de la resistencia, que permita la identificación de los individuos resistentes a la acción de un fungicida, los que según su número determinarán si la resistencia se está afianzando dentro de la población (Van Den Bosch *et al.*, 2011).

En *M. fijiensis* el método de monitoreo más confiable para identificar la presencia de individuos resistentes consiste en la medición de la longitud del tubo germinativo de esporas que germinan en presencia del fungicida (FRAC, 2008). No obstante en una población de *M. fijiensis* se pueden encontrar diferentes niveles de inhibición de los tubos germinativos a una concentración del fungicida, por lo que algunos individuos resistentes pueden pasar desapercibidos (Pérez-Vicente, 2006).

Con esta investigación se busco complementar los métodos actuales para monitorear la resistencia a los fungicidas piraclostrobin, epoxiconazol y tridemorf, al aumentar las variables fenotípicas que pueden ser relacionadas con el nivel de sensibilidad, lo que daría mayor certeza al identificar los individuos resistentes y de esta forma poder definir con anterioridad a la aplicación de uno de estos ingredientes activos si la población patógena se encuentra conformada por un mayor o menor número de individuos tolerantes a estos ingredientes activos y así evitar una mayor presión de selección sobre estos individuos.

identify the individuals resistant to the action of a fungicide, which, depending on their number, will determine if the resistance is being consolidated in the population (Van Den Bosch *et al.*, 2011).

In *M. fijiensis*, the most reliable monitoring method to help identify the presence of resistant individuals consists of measuring the length of the germ tube of spores that germinate in the presence of the fungicide (FRAC, 2008). Nevertheless, in a population of *M. fijiensis*, different levels of inhibition of the germ tubes can be found for one concentration of the fungicide, and therefore some resistant individuals could go unnoticed (Pérez-Vicente, 2006).

The aim of this investigation was to compliment current methods for monitoring the resistance to the fungicides piraclostrobin, epoxiconazol, and tridemorf, by increasing the phenotypical variables that could be related to levels of sensitivity, which would give a greater degree of certainty by identifying the resistant individuals, thus defining the application of one of these active ingredients beforehand if the pathogenic population is composed of a greater or lower number of individuals tolerant to those active ingredients, therefore avoiding a greater selection pressure on these individuals.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

The experimental design was carried out taking the following into consideration:

- 1) Each *finca*, or property, was taken as an independent pathogenic population, the individuals of which were represented by the multiple spores or individuals produced in the infectious cycle of the disease. 2) If the phenotype is considered the expression of the genotype based on a given

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El diseño experimental se realizó a partir de las siguientes consideraciones:

1) Cada finca se tomó como una población patógena independiente cuyos individuos estuvieron representados por las múltiples esporas o individuos producidos en el ciclo infeccioso de la enfermedad. 2) Si se considera al fenotipo como la expresión del genotipo en función de un determinado ambiente y que en el ambiente de *M. fijiensis* la presión ejercida por los fungicidas favorece los genotipos que permiten tolerar en mayor medida la acción de estos fungicidas, se esperaría por lo tanto que si hay un genotipo favorecido este se expresaría a través de rasgos fenotípicos identificables entre individuos. 3) Por evaluaciones previas se ha observado que diferentes rasgos fenotípicos se repiten entre individuos, indicando que probablemente exista una relación entre estos rasgos. 4) Los ingredientes activos evaluados han sido aplicados comercialmente en campo, por lo que la población y los individuos patógenos de este estudio ya han sido sometidos a la presión de selección de estos fungicidas. En base a estas consideraciones se diseñaron experimentos *in vitro* dirigidos a comparar si la sensibilidad poblacional (finca) o la sensibilidad individual (monospóric) hacia piraclostrobin, epoxiconazol y tridemorf, tiene relación con el comportamiento fenotípico de cada individuo.

VARIABLES fenotípicas evaluadas

Se realizó una caracterización fenotípica que permitió dividir los aislamientos en dos grupos, uno conformado por dos variables cuantitativas y el otro conformado por seis variables cualitativas (Figura 1). El primer grupo estuvo conformado por

environment, and that in *M. fijiensis*' environment, the pressure exerted by the fungicides favors the genotypes that help tolerate, to a greater or lesser degree, the action of these fungicides, it would be therefore expected that if there is a favored genotype, it would express itself through phenotypical traits, identifiable among individuals. 3) Previous evaluations have shown that different phenotypical traits repeat themselves between individuals, indicating a probable relationship between these traits. 4) The active ingredients evaluated have been used commercially on the field, therefore the population and the pathogenic individuals of this study have already undergone the selection pressure of these fungicides. Based on these conditions, *in vitro* experiments were designed to compare if the population sensitivity (property) or the individual sensitivity (monosporic) to piraclostrobin, epoxiconazol, and tridemorf, is related to the phenotypic behavior of each individual.

Phenotypic Variables Evaluated

A phenotypic characterization was performed which helped divide the isolates into two groups, one made up of quantitative variables, and the other, by six qualitative variables (Figure 1). The first group was composed of the phenotypic data, qualified quantitatively: length of the germ tube and biomass production (weight of the mycelium); the second group was composed of qualitative variables: 1) number of germ tubes (one germ tube only, two germ tubes of similar lengths or two unequal germ tubes in which one is less than half as long as the other. 2) Branching of the germ tube (germ tubes, branched or not branched. 3) Color of the mycelium (white, pink, or gray), 4) Morphology of the mycelium (circular division on the mycelium, parallel division on the mycelium, irregular division and indefinite division, 5)

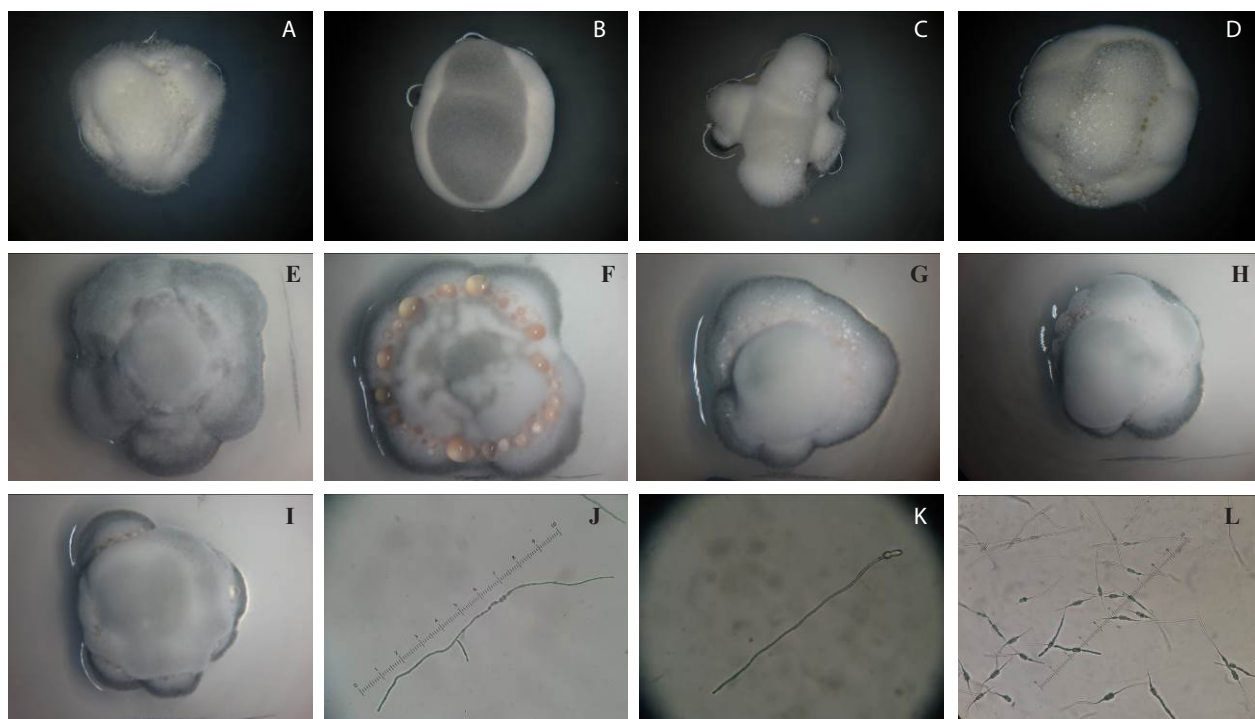


Figura 1. Variables fenotípicas cualitativas. De izquierda a derecha: A) Color blanco, morfología indefinida, con exudado, forma amorfa. B) color gris, morfología paralela, sin exudado, forma ovoide. C) color blanco, morfología indefinida, sin exudado, forma amorfa. D) color blanco, morfología paralela, con exudado, forma ovoide. E) color gris, morfología circular, sin exudado, forma ovoide. F) color rosa, morfología irregular, con exudado, forma ovoide. G) color rosa, morfología circular, con exudado, forma ovoide. H) color rosa, morfología paralela, con exudado, forma ovoide. I) color gris, morfología indefinida, con exudado, forma ovoide. J) dos tubos germinativos de similar longitud, con ramificaciones. K) un solo tubo germinativo, sin ramificaciones. L) dos tubos germinativos de similar longitud y en el que uno mide menos de la mitad del otro, sin ramificaciones.

Figure 1. Qualitative phenotypic variables. From left to right: A) White, undefined morphology, with exudate, amorphous shape. B) Gray, parallel morphology, no exudate, oval-shaped. C) white, undefined morphology, no exudate, amorphous shape. D) white, parallel morphology, with exudate, oval-shaped. E) gray, circular morphology, no exudate, oval-shaped. F) pink, irregular morphology, with exudate, oval-shaped. G) pink, circular morphology, with exudate, oval-shaped. H) pink, parallel morphology, with exudate, oval-shaped. I) gray, undefined morphology, with exudate, oval-shaped. J) two germ tubes of similar length with ramifications. K) one germ tube, without ramifications. L) two germ tubes of similar length where one is less than half the length of the other, without ramifications.

los rasgos fenotípicos calificados cuantitativamente: Longitud del tubo germinativo y Producción de biomasa (peso del micelio); el segundo grupo estuvo constituido por variables cualitativas: 1) Número de tubos germinativos (Un solo tubo germinativo, dos tubos germinativos de similar longitud o dos tubos germinativos desiguales en el cual uno mide menos de la mitad del otro. 2) Ramificación

Presence of exudate (exudate present or absent, 6) Shape of the mycelium (ovoidal or undefined “amorphous”).

Plant Material

Plant samples were used with symptoms of being in stage six of the disease (final stage of the disease, characterized by sexual recombination and

del tubo germinativo (Tubos germinativos con ramificaciones o sin ramificaciones, 3) Color del micelio (Color blanco, rosa o gris), 4) Morfología del micelio (división circular sobre el micelio, división paralela sobre el micelio, división de forma irregular y división de forma indefinida, 5) Presencia de exudado (exudado presente o ausente, 6) Forma del micelio (ovoide o indeterminada “amorfa”).

Material vegetal

Se emplearon muestras vegetales con síntomas en estadio seis de la enfermedad (estadio final de la enfermedad caracterizado por la recombinación sexual y la producción de esporas), obtenidas durante los años 2013 y 2014, desde 12 fincas bananeras de Colombia, siete ubicadas en la región de Urabá y seis en la región de Santa Marta. De las 12 fincas, 10 fueron fincas comerciales y por lo tanto la población patógena allí ubicada ha sido constantemente sometida a la presión de los fungicidas y se espera que en mayor o menor medida hayan generado pérdida de sensibilidad, mientras las dos fincas restantes (nombradas como finca silvestre) no son fincas comerciales, por lo que la población patógena que allí se encuentra no ha sido sometida a la presión de los fungicidas y presenta altos niveles de sensibilidad hacia los diferentes ingredientes activos.

Determinación de la sensibilidad poblacional de *M. fijiensis* a los fungicidas

Inicialmente se cuantificó la sensibilidad en cada finca a partir del protocolo avalado por FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*) (FRAC, 2008) para la evaluación de fungicidas sistémicos en *M. fijiensis*, denominado como “*Ascospore germ tube elongation*” basado en la medición de la longitud del tubo germinativo que permite valorar el nivel de sensibilidad poblacional a partir del promedio de mediciones individuales. Las concentraciones

the production of spores), obtained during 2013 and 2014, from 12 banana-producing properties in Colombia, seven of which are found in the Urabá region, and six in the Santa Marta region. Out of the 12 properties, 10 were commercial properties, and therefore the pathogenic population found there has been constantly placed under the pressure of fungicides, and they are expected to have lost, to a greater or lesser degree, their sensitivity, whereas in the two remaining properties (named as wild *fincas*) are not commercial properties, so the pathogenic populations found there have not undergone the pressure of fungicides and show high levels of sensitivity towards the different active ingredients.

Determining the Sensitivity of *M. fijiensis* Populations to Fungicides

Initially, the sensitivity was measured in each property using the protocol endorsed by FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*) (FRAC, 2008) for the evaluation of systemic fungicides in *M. fijiensis*, called “*Ascospore germ tube elongation*,” based on the measurement of the length of the germ tube, which helps value the level of population sensitivity from the average of individual measurements. Both the concentrations and the number of individuals or spores measured were fixed according to FRAC specifications. For fungicides QoI to which piraclostrobin belongs, three concentrations were evaluated for every property (0 - 1 - 10 mg/L) and 600 spores were measured for each property. For the two remaining active ingredients, the specifications given for SBI (*Sterol Biosynthesis Inhibitors*)-type synthesis were taken, to which both epoxiconazol and tridemorf belong. In this way, for epoxiconazol, for every *finca* 210 spores were evaluated in five concentrations (0 - 0.01 - 0.03 - 0.1 and 1 mg/L). For tridemorf, six concentrations were evaluated (0

así como el número de individuos o esporas medidas se fijaron según las especificaciones FRAC. Para fungicidas QoI al que pertenece piraclostrobin se evaluaron por finca tres concentraciones (0-1-10 mg/L) y se midió un número de 600 esporas por finca. Para los dos ingredientes activos restantes se tomaron las especificaciones dadas para fungicidas tipo SBI's (*Sterol Biosynthesis Inhibitors*) al que pertenecen tanto epoxiconazol como tridemorf. De esta forma para el epoxiconazol se evaluaron por finca 210 esporas en cinco concentraciones (0 - 0.01 - 0.03 - 0.1 y 1 mg/L). Mientras para el tridemorf se evaluaron seis concentraciones (0 - 0.1-0.3 - 1 - 3 y 10 mg/L) y un número de 240 esporas por finca.

Aislamiento monospóricos

Luego de establecer la sensibilidad poblacional y a partir de este mismo montaje se seleccionaron al azar esporas germinadas en ausencia del fungicida (0 mg/L), a las que previamente se les cuantificó la longitud, la existencia de ramificaciones y el número de tubos germinativos. Estas esporas fueron aisladas por medio de un microscopio de luz y un capilar de vidrio y llevadas a medio nutritivo PDA donde crecieron a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) por un periodo de 40 días hasta obtener un cultivo monospórico. Transcurrido este tiempo se determinó el color, la morfología, la presencia de exudado y la forma del micelio, luego y aprovechando el crecimiento compacto no extendido de *M. fijiensis* bajo condiciones *in vitro*, el total de micelio fue pesado en balanza analítica y se pudo cuantificar la biomasa producida. Se obtuvo un total de 123 cultivos monospóricos sobre los que se realizaron las comparaciones.

Determinación de la sensibilidad individual de *M. fijiensis* a los fungicidas

A partir de los 123 cultivos monospóricos, se

- 0.1 - 0.3 - 1 - 3 and 10 mg/L) and 240 spores for every *finca*.

Monosporic Isolates

After establishing population sensitivity and from this setup, germinated spores were selected at random in the absence of the fungicide (0 mg/L), which were previously quantified for length, the existence of ramifications, and number of germ tubes. These spores were isolated using a light microscope and a glass capillary tube, and transferred to a PDA nutritional medium where they grew at room temperature (26 ± 1 °C) for 40 days until a monospore culture was obtained. After this time, the color, morphology, the presence of an exudate, and the shape of the mycelia were determined. Next, and taking advantage of the compact and non-extended growth of *M. fijiensis* under *in vitro* conditions, the total mycelia were weighed using an analytic scale, and the biomass produced was quantified. A total of 123 monospore cultures was obtained, and comparisons were carried out on these.

Determining the Individual Sensitivity of *M. fijiensis* to Fungicides

Out of the 123 monospore cultures, those with the greatest differences in the length of the germ tube and weight of the mycelia were chosen (since the sensibility measurements were based on these traits) and a total of 41 monospore isolates was obtained; their individual sensitivity to the three active ingredients was quantified using spectrophotometric microtechnics (Table 1). This technique is also endorsed by FRAC, but not for *M. fijiensis*, since the absence of sexual sporulation of this pathogen *in vitro* implies that this evaluation must be performed on monospore cultures or on a limited number of individuals that would not represent the population. In this way, this technique

seleccionaron los de mayores diferencias en la longitud del tubo germinativo y en el peso del micelio (debido a que sobre estos rasgos se basó la cuantificación de sensibilidad) y se obtuvo un total de 41 aislamientos monospóricos a los que se les cuantificó la sensibilidad individual a los tres ingredientes activos empleando microtécnica espectrofotométrica (Cuadro 1). Esta técnica es también avalada por FRAC pero no para *M. fijiensis*, debido a que la ausencia de esporulación sexual de este patógeno bajo condiciones *in vitro* implica que esta evaluación deba realizarse sobre cultivos monospóricos o sobre un limitado número de individuos que no representarían la población, de esta forma esta técnica no sería útil para la determinación de la sensibilidad de una población pero sí para determinar la sensibilidad de un individuo de esa población. Esta técnica se basó en preparar a partir del micelio de cada uno de los 41 aislamientos monospóricos, una suspensión a una concentración de 10^4 fragmentos de micelio/ml, que fue puesta en incubación durante ocho días en platos ELISA de 96 pozos. Para cada ingrediente activo se evaluaron cuatro concentraciones: piraclostrobin (0 - 0.1 - 1 - 20 mg/L); epoxiconazol (0 - 0.1 - 1 y 10 mg/L) y tridemorf (0 - 1 - 10 y 100 mg/L). Estas concentraciones se fijaron a partir de evaluaciones previas en las que se estableció el rango de inhibición para cada uno de los ingredientes activos cuando se empleó esta técnica.

Cuantificación de la sensibilidad

El parámetro empleado para cuantificar la sensibilidad tanto a nivel poblacional como individual fue la IC_{50} “*half maximal inhibitory concentration*”, calculada a partir de la regresión lineal de dos puntos ($Y = mX + b$), donde los puntos graficados fueron las concentraciones por encima y por debajo entre las que se encontraría el 50 % de inhibición y la curva resultante para cada fungicida se represen-

would not be useful for determining the sensitivity of a population, but it would be to determine the sensitivity of an individual from that population. This technique was based on the preparation, based on the mycelia of each one of the 41 monospore isolates, a suspension at a concentration of 10^4 mycelium fragments/ml, which was incubated for eight days in eight ELISA dishes with 96 pits. For each active ingredient, four concentrations were evaluated: piraclostrobin (0 - 0.1 - 1 - 20 mg/L); epoxiconazol (0 - 0.1 - 1 and 10 mg/L) and tridemorf (0 - 1 - 10 y 100 mg/L). These concentrations were fixed from previous evaluations in which the inhibition range was established for each active ingredient when this technique was used.

Quantification of Sensitivity

The parameter used to quantify the sensitivity, both at a population and an individual level, was the IC_{50} “*half maximal inhibitory concentration*”, calculated from a linear regression of two points ($Y = mX + b$), where the points graphed were the concentrations above and below, between which would lie 50 % of inhibition and the resulting curve for each fungicide was represented in an Excel spreadsheet, along with the IC_{50} estimated. The estimated IC_{50} was the dose or concentration (X axis) produced by 50 % inhibition (Y axis) in the curve (Chinn, 1997).

Statistical Analysis

In order to establish if there were significant differences between the expression of the different phenotypical features, as well as between the expression of these ranges with individual or population sensitivity to the fungicides evaluated, variance analyses were carried out with 95 % confidence to compare between the factors that represent the quantitative variables: a) Length of the germ tube, b) Production of biomass, c) Population

Cuadro 1. Rasgos fenotípicos para los 41 aislamientos monospóricos (31 provenientes de fincas comerciales y 10 provenientes de fincas silvestres) a los que se les midió la sensibilidad tanto por medición del tubo germinativo como por microtécnica. (A) Aislamiento. (T) Número de tubos germinativos. (R) Ramificación. (C) Color (bl: blanco. ro: rosa. gr: gris). (M) Morfología (ci: circular. pa: paralela. in: indefinida. irr: irregular). (E) Exudado (au: ausente. pr: presente). (F) Forma (am: amorfa. ov: ovoide). (um) Longitud tubo germinativo. (mg) Peso biomasa. (P.t) IC₅₀ piraclostrobin tubo germinativo. (E.t) IC₅₀ epoxiconazol tubo germinativo. (T.t) IC₅₀ tridemorf tubo germinativo. (P.m) IC₅₀ piraclostrobin microtécnica. (E.m) IC₅₀ epoxiconazol microtécnica. (T.m) IC₅₀ tridemorf microtécnica.

Table 1. Phenotypic traits for the 41 monospore isolates (31 from commercial properties and 10 from wild properties) which were measured for sensitivity via measurement of the germ tube and microtechnics. (A) Isolation. (T) Number of germ tubes. (R) Ramification. (C) Color (bl:white. ro: pink. gr: gray). (M) Morphology (ci: circular. pa: parallel. in: undefined. irr: irregular). (E) Exudate (au: absent. pr: present). (F) Shape (am: amorphous. ov: oval). (um) Length germ tube. (mg) Bio-mass weight. (P.t) IC₅₀ piraclostrobin germ tube. (E.t) IC₅₀ epoxiconazol germ tube. (T.t) IC₅₀ tridemorf germ tube. (P.m) IC₅₀ piraclostrobin microtechnics. (E.m) IC₅₀ epoxiconazol microtechnics. (T.m) IC₅₀ tridemorf microtechnics.

Aislamientos Monospóricos, Rasgos Fenotípicos y Sensibilidad														
A	T	R	C	M	E	F	um	mg	P.t	E.t	T.t	P.m	E.m	T.m
C1	uno	no	bl	ci	au	am	187	207	0,87	0,17	1,56	5,4	1,3	9,3
C2	dos	no	gr	in	pr	am	96	122	0,87	0,17	1,56	11,3	0,7	17,3
C3	uno	si	gr	pa	au	ov	172	70	0,87	0,17	1,56	7,0	2,4	25,8
C4	uno	no	gr	in	au	am	213	135	0,87	0,17	1,56	7,0	1,0	28,4
C5	mitad	si	bl	pa	au	ov	182	297	0,88	0,28	1,70	14,0	0,9	58,8
C6	dos	no	gr	irr	pr	am	76	135	0,88	0,28	1,70	8,5	0,9	23,6
C7	mitad	si	gr	ci	au	am	177	68,6	0,88	0,28	1,70	15,7	3,7	53,5
C8	mitad	si	gr	in	au	ov	288	114	0,88	0,28	1,70	14,3	0,8	16,1
C9	mitad	no	gr	ci	pr	am	127	74,2	0,62	0,30	1,46	14,4	0,5	46,9
C10	dos	si	bl	in	au	am	101	279	0,62	0,30	1,46	6,6	0,6	17,2
C11	dos	si	ro	pa	pr	ov	202	197	0,62	0,30	1,46	8,3	3,6	9,1
C12	dos	no	gr	ci	au	ov	116	141	0,60	0,21	0,72	7,8	0,9	9,1
C13	mitad	si	bl	irr	au	am	283	244	0,60	0,21	0,72	9,0	0,6	8,1
C14	mitad	no	gr	irr	au	ov	202	92,5	0,60	0,21	0,72	17,4	0,7	9,6
C15	mitad	no	gr	in	pr	ov	152	119	0,64	0,09	0,29	0,1	0,6	7,8
C16	mitad	si	ro	irr	pr	ov	86	278	0,64	0,09	0,29	0,1	1,0	8,1
C17	dos	no	gr	irr	pr	ov	71	127	0,58	0,08	0,62	7,3	7,3	6,4
C18	dos	si	gr	in	pr	ov	91	112	0,58	0,08	0,62	15,2	0,6	84,0
C19	mitad	no	ro	pa	pr	ov	157	245	0,58	0,08	0,62	0,1	0,9	61,9
C20	mitad	si	bl	pa	pr	ov	334	220	0,88	0,32	2,41	11,2	0,9	22,9
C21	mitad	si	ro	pa	pr	ov	152	257	0,88	0,32	2,41	11,4	4,7	67,9
C22	dos	si	ro	pa	pr	ov	96	179	0,88	0,32	2,41	9,8	3,8	59,5
C23	mitad	no	gr	in	au	ov	127	161	0,69	0,08	1,53	4,7	0,6	50,5
C24	mitad	si	ro	in	pr	ov	207	309	0,69	0,08	1,53	0,4	4,0	7,4
C25	dos	no	gr	pa	au	ov	111	131	0,71	0,37	2,43	0,1	0,9	29,8
C26	mitad	si	bl	irr	pr	ov	390	217	0,71	0,37	2,43	13,9	6,3	62,2
C27	dos	no	gr	in	au	ov	162	72,6	0,71	0,37	2,43	15,6	0,9	55,7
C28	uno	si	gr	pa	pr	am	334	199	0,78	0,17	1,62	13,6	1,5	59,7
C29	mitad	si	gr	irr	pr	am	177	106	0,78	0,17	1,62	8,8	0,9	62,9
C30	dos	si	ro	pa	au	ov	132	263	0,78	0,17	1,62	11,5	0,7	9,3
C31	dos	si	bl	in	au	ov	96	110	0,78	0,17	1,62	13,3	6,8	4,0
S1	mitad	no	bl	pa	pr	ov	258	140	0,52	0,01	1,99	0,1	0,0	0,8
S2	dos	si	bl	in	pr	ov	56	93,6	0,52	0,01	1,99	0,1	0,0	0,9
S3	mitad	no	gr	in	pr	ov	187	99,1	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	8,0
S4	dos	no	ro	pa	pr	ov	213	273	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	11,0
S5	dos	si	gr	irr	pr	am	182	261	0,50	0,01	1,56	0,1	0,0	0,7
S6	dos	si	ro	in	au	ov	142	399	0,50	0,01	1,56	0,1	0,0	2,3
S7	dos	si	gr	ci	au	ov	142	50,8	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	89,0
S8	dos	si	gr	pa	pr	ov	278	212	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	60,5
S9	dos	no	gr	pa	pr	ov	197	221	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	18,3
S10	dos	si	gr	pa	au	am	15	140	0,52	0,01	1,99	0,1	0,1	69,3

Fincas Comerciales

Fincas Silvestre

tó en un gráfico de Excel junto con la IC_{50} estimada. La IC_{50} estimada fue la dosis o concentración (eje X) que produjo el 50 % de inhibición (eje Y) en la curva (Chinn, 1997).

Análisis estadístico

Para establecer si existieron diferencias significativas entre la expresión de los diferentes rasgos fenotípicos, además entre la expresión de estos rasgos con la sensibilidad individual o poblacional a los fungicidas evaluados, se realizaron análisis de varianza con un 95 % de confianza para comparar entre los factores que representan las variables cuantitativas: a) Longitud del tubo germinativo, b) Producción de biomasa, c) Sensibilidad poblacional o individual a cada ingrediente activo (IC_{50}). Y los factores que representan las variables cualitativas: a) Número de tubos germinativos, b) Ramificación del tubo germinativo, c) Coloración del micelio, d) Morfología del micelio, e) Presencia de exudado, f) Forma del micelio. Aceptando la significancia estadística siempre que el P-valor fuera menor que 0.05 (Cuadro 2). Se realizaron además pruebas de comparaciones múltiples dentro de los factores empleando el método de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) para definir si existieron diferencias significativas entre las medias obtenidas para cada variable cuantitativa cuando se comparó con la presencia de cada rasgo que representa las variables cualitativas (Cuadro 3).

Ingredientes activos

Los ingredientes activos evaluados, piraclostrobin; epoxiconazol y tridemorf, fueron tomados desde productos pertenecientes a la empresa BASF Química S.A. y empleados en la industria bananera bajo los nombres comerciales de COMET (Piraclostrobin 250 g/L); OPUS (Epoxiconazol 75 g/L) y CALIXIN (Tridemorf 750 g/L).

or individual sensitivity to each active ingredient (IC_{50}). And the factors that represent the qualitative variables: a) Number of germ tubes, b) Branching of germ tube, c) Color of mycelium, d) Morphology of the mycelium, e) Presence of exudate, f) Shape of mycelium. Accepting the statistical significance as long as the P-value is less than 0.05 (Table 2). Likewise, multiple comparison tests within the factors were carried out using Fisher's minimum significant difference method (LSD) to define if there were significant differences between the averages obtained for each quantitative variable when compared to the presence of each trait that the qualitative variables represent (Table 3).

Active Ingredients

The active ingredients evaluated (piraclostrobin, epoxiconazol, and tridemorf), were taken from products belonging to the company BASF Química S.A. and used in the banana industry under the commercial names of COMET (Piraclostrobin 250 g/L), OPUS (Epoxiconazol 75 g/L), CALIXIN (Tridemorf 750 g/L).

RESULTS

Phenotypic Traits related to the Length of the Germ Tube

The variance analysis showed differences between factors for the number of germ tubes (Table 2y). In this way, within factors, when comparing averages, it was observed that spores that generated two germ tubes, but in which one reached less than half of the other's length, displayed a significant relation with germ tubes of greater length ($X=216$ um). However, when two tubes were presented with similar sizes, they related to a shorter length ($X=150$ um). Spores that only generated one germ tube were related to intermediate lengths

Cuadro 2. P-valor obtenidos a partir de análisis de varianza que comparó entre variables las cuantitativas (T.g: longitud tubo germinativo; P.b: producción biomasa; In: sensibilidad individual hacia el fungicida; Po: sensibilidad poblacional hacia el fungicida) y las variables cualitativas (y). Y cuando se comparó solo entre las variables cuantitativas (z). Desde que el P-valor fuera inferior a 0,05, existió significancia estadística.

Tabla 2. P-value obtained from the variance analysis that compared quantitative variables (T.g: length germ tube; P.b: biomass production; In: individual sensitivity to fungicide; Po: population sensitivity to fungicide) and qualitative variables (y). And when comparing only between quantitative variables (z). From the moment the P-value was lower than 0,05 was there a statistical significance.

Significancia Estadística entre Factores (P-valor)								
(y)								
Factores	T.g	P.b	Piraclostrobin		Epoconazol		Tridemorf	
			In	Po	In	Po	In	Po
Tubo germinativo	0,0001	0,54	0,59	0,026	0,542	0,630	0,485	0,116
Ramificación	0,0006	0,73	0,30	0,135	0,318	0,579	0,025	0,578
Color	0,0407	0,00	0,70	0,467	0,602	0,688	0,043	0,702
Morfología	0,6637	0,28	0,98	0,467	0,386	0,432	0,142	0,586
Exudado	0,5818	0,82	0,38	0,013	0,532	0,063	0,755	0,277
Forma	0,6954	0,13	0,78	0,040	0,134	0,567	0,769	0,255
(z)								
Fungicida	T.g		P.b	P.b vs T.g				
	In	Po	In					
Piraclostrobin	0,33	0,66	0,83	0,68				
Epoconazol	0,43	0,41	0,70					
Tridemorf	0,78	0,45	0,38					

RESULTADOS

Rasgos fenotípicos asociados a la longitud del tubo germinativo

El análisis de varianza mostró diferencias entre factores para el número de tubos germinativos (Cuadro 2y). Es así como dentro de los factores al comparar las medias se observó que las esporas que generaron dos tubos germinativos, pero en el que uno de ellos alcanzó menos de la mitad del otro, presentaron una relación significativa con tubos germinativos de mayor longitud (X=216 um). Sin embargo cuando se presentaron también dos tubos pero ambos tuvieron tamaños similares se relacionaron con una menor longitud (X=150 um). Espo-

and showed no significant differences with those spores with two germ tubes (X=185 um). The individuals that presented two similar-sized germ tubes, and therefore the shortest length, were the majority of the population, and represented 55 % of it, whereas those with greater lengths represented 34 % of the population (Table 3u). The existence of ramifications was another factor that presented significant differences between factors in relation to the length of the germ tube (Table 2y). Within the factors, and when comparing the averages, the appearance of these ramifications was significantly more related to longer germ tubes (X=208 um) than to shorter tubes (X=159 um). Individuals that presented ramifications and a greater length were the majority of the population, and accounted for 59 % (Table 3u). Germ tube length also displayed

Cuadro 3. Se muestra los rasgos evaluados, el número de individuos con ese rasgo, su porcentaje poblacional, la media estadística de la longitud del tubo germinativo en micrómetros (u), la media estadística del peso de la biomasa en miligramos (v), la media estadística de las IC₅₀ para los rasgos fenotípicos asociados a la sensibilidad poblacional a piraclostrobin (w), epoxiconazol (x), tridemorf (z), y la sensibilidad individual al tridemorf (y). (*) Indica diferencia significativa al comparar factores.

Table 3. The traits evaluated are shown, along with the number of individuals with each feature, its population percentage, the statistical average of the germ tube length in micrometers (u), the statistical average of the weight of the biomass in milligrams (v), the statistical average of the IC₅₀ for the phenotypical traits related to the sensitivity of the population to piraclostrobin (w), epoxiconazol (x), tridemorf (z), and the individual sensitivity to tridemorf (y). (*) indicates significant difference when comparing factors.

Comparaciones Múltiples Dentro de Factores																			
Producción de Biomasa (v)				Tubo Germinativo (u)															
Color	#	%	Mean	Tubos	#	%	Mean	Color	#	%	Mean								
Gris	65	53	138,6	Dos	67	55	150	Rosa	28	23	160								
Blanco	30	24	172,8	Uno	14	11	185	Gris	65	53	180								
Rosa	28	23	210,2	Mitad	42	34	216	Blanco	30	24	210								
Blanco-Gris			* 34,1659	Dos-Mitad			* -12,8568	Blanco-Rosa			* 9,83423								
Blanco-Rosa			* -37,4329																
Gris-Rosa			* -71,5988																
				#	%	Mean	Individual Tridemorf (y)												
				No	50	41	159	#	%	Mean									
Poblacional Piraclostrobin (w)				Si				73	59	208	Irregular	8	19	8,17					
Tubos				No - Si				* -9,69532	Indefinida				13	32	14,8				
Dos	67	55	0,697					Circular				5	12	31,9					
Mitad	42	34	0,697	Poblacional Epoxiconazol (x)				Paralela				15	37	32,1					
Uno	14	11	0,805	Exudado				#	%	Mean	Irregular-Paralela			* -23,94					
Dos-Uno			* -0,108017	Presente				73	59	0,18									
Mitad-Uno			* -0,107801	Ausente				50	41	0,23	Color			#	%	Mean			
				Ausente-Presente				* 0,0491	Blanca				9	22	13				
Exudado				#	%	Mean					Rosa			9	22	14,8			
Presente				73	59	0,699	Poblacional Tridemorf (z)				Gris			23	56	37,5			
Ausente				50	41	0,767	Morfología				#	%	Mean	Blanca-Gris			* -24,551		
Ausente-Presente			*0,06662	Circular				23	19	1,54	Gris-Rosa			* 22,778					
				Irregular				27	22	1,59									
Forma				#	%	Mean	Indefinida				31	25	1,76	Ramificación			#	%	Mean
Ovoide	88	72	0,703	Paralela				42	34	1,87	No			17	41	11,5			
Amorfa	35	28	0,763	Circular - Paralela				* -0,3285	Si				24	59	32				
Amorfa-Ovoide			* 0,06023	Irregular - Paralela				* -0,2783	No - Si				* -20,4421						

ras que solo generaron un tubo germinativo se relacionaron a longitudes intermedias y no presentaron diferencias significativas con aquellas esporas de dos tubos germinativos (X=185 um). Los individuos que presentaron dos tubos germinativos de tamaño similar y por lo tanto la menor longitud fueron mayoría dentro de la población y representaron

significant differences between factors with the mycelium color (Table 2y). Within the factors, and in the comparison of averages, it was observed that a greater length gave rise to a white mycelium (X=210 um), while a shorter length generated pink mycelia (X=160 um). No significant differences were observed when the mycelium obtained was

el 55 % de esta, mientras los de mayor longitud representaron un 34 % de la población (Cuadro 3u). La existencia de ramificaciones fue otro factor que presentó diferencias significativas entre factores en relación a la longitud del tubo germinativo (Cuadro 2y). Dentro de los factores y al comparar las medias la aparición de estas ramificaciones estuvo significativamente relacionada a tubos germinativos de mayor longitud ($X=208$ μm) que a de menor longitud ($X=159$ μm). Los individuos que presentaron ramificaciones y una mayor elongación fueron mayoría dentro de la población y representaron el 59 % (Cuadro 3u). La longitud del tubo germinativo también presentó diferencias significativas entre los factores con el color del micelio (Cuadro 2y), dentro de los factores y al comparar las medias se observó que una mayor longitud dio lugar a micelio color blanco ($X=210$ μm), mientras una menor longitud generó micelio color rosa ($X=160$ μm). No existieron diferencias significativas cuando se obtuvo micelio color gris ($X=180$ μm). El micelio de color gris relacionado con esporas de tubo germinativo de tamaño intermedio fue mayoría dentro de la población y representó el 53 %. Mientras el micelio de color blanco relacionado a una mayor longitud representó un 24 % de la población, porcentaje similar al 23 % del micelio color rosa relacionado a una menor longitud (Cuadro 3u).

Rasgos fenotípicos asociados a la producción de biomasa

Existieron diferencias significativas entre los factores para la cantidad de biomasa producida por cada individuo y el color del micelio (Cuadro 2y). Dentro de los factores y al comparar las medias los individuos de menor peso correspondieron a los de color gris ($X=139$ mg), los de color blanco se relacionaron a un peso mayor que el gris ($X=173$ mg) pero menor que el rosa ($X=210$ mg), que fue el color asociado a una mayor producción de biomasa.

gray ($X=180$ μm). The gray mycelia related to medium-sized germ tube spores were the majority in the population, with 53 %. Meanwhile, the white mycelia related to a greater length accounted for 24 % of the population, a similar percentage to the 23 % of the pink mycelia related to a shorter length (Table 3u).

Phenotypic Traits Related to Biomass Production

There were significant differences between factors for the amount of biomass produced by each individual and the color of the mycelia (Table 2y). Within the factors, and in the comparison of the averages, individuals that weighed less corresponded to those colored gray ($X=139$ mg), white ones were related to a heavier weight than gray ($X=173$ mg), although lighter than pink ($X=210$ mg), which was the color related to a greater production of biomass. Proportional distribution indicated that 53 % of all individuals showed gray mycelia, and therefore lower weight, while 24 % presented white mycelia, and the remaining 23 % displayed pink mycelia and a higher weight (Table 3v).

Phenotypic Traits Related to Sensitivity to Fungicides

The level of sensibility to the evaluated fungicides was established using an IC_{50} found by spectrophotometric microtechnics from monospore crops that helped find a response for individuals, as well as an IC_{50} found from the average of the lengths reached by the germ tubes of a particular number of spores that helped find a response for the population.

Piraclostrobin

Individual Response. Among the factors, no significant differences were found between the

La distribución proporcional indicó que un 53 % de los individuos presentaron micelio color gris y por lo tanto un menor peso, mientras un 24 % presentó micelio color blanco y el 23 % restante presentó micelio color rosa y un mayor peso (Cuadro 3v).

Rasgos fenotípicos asociados a la sensibilidad a fungicidas

Se estableció el nivel de sensibilidad hacia los fungicidas evaluados a través de una IC_{50} hallada por microtécnica espectrofotométrica desde cultivos monospóricos que permitieron conocer una respuesta individual y a través de una IC_{50} hallada a partir del promedio de las longitudes alcanzadas por los tubos germinativos de un número determinado de esporas que permitieron conocer una respuesta poblacional.

Piraclostrobin

Respuesta individual. Entre los factores no se encontraron diferencias significativas entre la sensibilidad de un individuo hacia piraclostrobin y las características fenotípicas evaluadas (Cuadro 2y).

Respuesta poblacional: Entre los factores existieron diferencias significativas para el nivel de sensibilidad poblacional hacia piraclostrobin y el número de tubos germinativos (Cuadro 2y). Dentro de los factores y al comparar las medias se encontró que una spora con un solo tubo germinativo estuvo significativamente más relacionada a una población con una menor sensibilidad a piraclostrobin ($IC_{50}=0,805$) que una spora con dos tubos germinativos, estas últimas relacionadas a una población de mayor sensibilidad sin importar si uno de los tubos mide menos de la mitad del otro ($IC_{50}=0,697$). La distribución proporcional indicó que el 89 % de la población presentó dos tubos germinativos y por lo tanto una menor IC_{50} poblacional, mientras el 11

sensitivity of an individual to piraclostrobin and the phenotypical characteristics evaluated (Table 2y).

Population Response: Among the factors there were significant differences for the level of population sensitivity to piraclostrobin and the number of germ tubes (Table 2y). Within the factors, and in the comparison of averages, spores with only one germ tube were found to be significantly more related to a population with a lower sensitivity to piraclostrobin ($IC_{50}=0,805$) than spores with two germ tubes, the latter related to a more sensitive population, regardless of one of the tubes being less than half as long as the other ($IC_{50}=0,697$). Proportional distribution indicated that 89 % of the population presented two germ tubes, and therefore a lower population IC_{50} , whereas the remaining 11 % presented only one germ tube and a higher population IC_{50} (Table 3w). Also among the factors, significant differences were found with the production of exudate (Table 2y) and within the factors, comparing factors proved that isolated spores of a population with a lower IC_{50} ($IC_{50}=0,699$), and therefore a greater sensitivity to piraclostrobin, were significantly more related with the production of exudate in their mycelia, while the increase in the IC_{50} ($IC_{50}=0,767$) was related with no production of exudate. Proportional distribution indicated that 59 % of the population presented exudates, whereas the remaining 41 % did not (Table 3w). Among factors, the shape of the mycelium of the monosporic crop also displayed significant with the sensitivity of the population to piraclostrobin (Table 2y), and within the factors it was found, when comparing averages, that the spores from a population with a lower IC_{50} ($IC_{50}=0,703$) were significantly related with an oval shape in their mycelia, whereas if the population displayed a greater IC_{50} ($IC_{50}=0,763$) the remaining mycelium was more related to a lack

% restante presentó un solo tubo germinativo y una mayor IC_{50} poblacional (Cuadro 3w). También se halló entre los factores diferencias significativas con la producción de exudado (Cuadro 2y) y dentro de los factores se encontró que al comparar las medias las esporas aisladas de una población con una menor IC_{50} ($IC_{50} = 0,699$) y por lo tanto una mayor sensibilidad a piraclostrobin estuvieron significativamente más relacionadas con la producción de exudado en su micelio, mientras que el aumento en las IC_{50} ($IC_{50} = 0,767$) se relacionó con la ausencia en la producción de exudado. La distribución proporcional indicó que el 59 % de la población presentó exudado, mientras el 41 % restante careció de él (Cuadro 3w). Entre los factores la forma del micelio del cultivo monospórico, también exhibió diferencias significativas con la sensibilidad de la población a piraclostrobin (Cuadro 2y). Y dentro de los factores se encontró al comparar las medias que esporas provenientes de una población con una menor IC_{50} ($IC_{50} = 0,703$) estuvieron significativamente relacionadas con una forma ovoide en su micelio, mientras que si la población presentaba una mayor IC_{50} ($IC_{50} = 0,763$) el micelio resultante estuvo más relacionado a no tener una forma determinada (amorfa). La distribución proporcional indicó que el 72 % de los individuos presentaron forma ovoide y por lo tanto estuvieron relacionados con una mayor sensibilidad a piraclostrobin, mientras el 28 % restante no presentó una forma determinada (Cuadro 3w).

Epoxiconazol

Comportamiento individual. Entre los factores no se encontraron diferencias significativas entre las características fenotípicas evaluadas y la sensibilidad de los individuos monospóricos hacia epoxiconazol (Cuadro 2y).

Comportamiento poblacional. Entre los facto-

of any particular shape (amorphous). Proportional distribution indicated that 72 % of the individuals presented an oval shape, and were therefore related to a greater sensitivity to piraclostrobin, while the remaining 28 % displayed no particular shape (Table 3w).

Epoxiconazol

Individual Response. Among the factors, no significant differences were found between the phenotypic characteristics evaluated and the sensitivity of the monospore individuals to epoxiconazol (Table 2y).

Population Response. Among the factors no significant differences were found (Table 2y), although within the factors and comparing averages, it was observed that population sensitivity to epoxiconazol displayed significant differences for the trait exudate production, since isolates from a more sensitive population to this active ingredient ($IC_{50} = 0,18$) displayed exudate, while less sensitive isolates did not ($IC_{50} = 0,23$). Proportional distribution indicated that 59 % of the population presented exudate, and therefore a higher sensitivity to epoxiconazol, while the remaining 41 % displayed no exudate (Table 3x).

Tridemorf

Individual response. Among the factors, significant differences were found for the existence of ramifications in the germ tube(s) (Table 2y). And within the factors, when comparing averages, it was observed that the presence of ramifications was significantly related to a lower sensitivity to tridemorf ($IC_{50} = 32$), while the absence of ramifications was related to a higher sensitivity ($IC_{50} = 11,5$). When analyzing the proportional distribution, it was found that individuals without

res no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 2y), sin embargo dentro de los factores y al comparar entre medias se observó que la sensibilidad poblacional a epoxiconazol presentó diferencias significativas para el rasgo producción de exudado, debido a que aislamientos provenientes de una población más sensible a este ingrediente activo ($IC_{50}=0,18$) presentaron exudado mientras aislamientos menos sensibles no lo presentaron ($IC_{50}=0,23$). La distribución proporcional indicó que el 59 % de la población presentó exudado y por lo tanto una mayor sensibilidad al epoxiconazol, mientras el 41 % restante no presentó exudado (Cuadro 3x).

Tridemorf

Comportamiento individual. Entre los factores se encontraron diferencias significativas para la existencia de ramificaciones en el tubo(s) germinativo (Cuadro 2y). Y dentro de los factores al comparar las medias se observó que la presencia de ramificaciones estuvo significativamente relacionada a una menor sensibilidad a tridemorf ($IC_{50}=32$), mientras la ausencia de ramificaciones se relacionó con una mayor sensibilidad ($IC_{50}=11,5$). Al analizar la distribución proporcional se encontró que los individuos sin ramificaciones fueron minoría dentro de la población (41 %), mientras los individuos con ramificaciones y una menor sensibilidad fueron mayoría (59 %) (Cuadro 3y). Entre los factores también se observaron diferencias significativas para el color del micelio (Cuadro 2y) y dentro de los factores al comparar las medias se observó que una menor sensibilidad del cultivo monospórico a tridemorf ($IC_{50}=37,5$) estuvo significativamente relacionada con un micelio color gris, mientras si el cultivo presentaba un color blanco ($IC_{50}=13$) o rosa ($IC_{50}=14,8$) se relacionó con una sensibilidad mayor. Cuando se evaluó la distribución proporcio-

ramifications were only a few in the population (41 %), while the individuals with ramifications and a lower sensitivity were the majority (59 %) (Table 3y). Among the factors, significant differences were also observed for the color of mycelia (Table 2y), and within the factors, when comparing averages, a lower sensitivity of the monospore culture to tridemorf ($IC_{50}=37,5$) was noticed to be significantly related to a gray mycelium, whereas if its color is white ($IC_{50}=13$) or pink ($IC_{50}=14,8$) it relates to a higher sensitivity. When the proportional distribution was evaluated, grey isolates related to a lower sensitivity to tridemorph were found to be the majority and accounted for 56% of the population, while white and pink isolates were found at equal proportions of 22 % (Table 3y). Within the factors, when comparing the averages for the trait of morphology, it was noticed that if a monospore culture presented a mycelium with an irregular morphology, this individual would be significantly more related to a higher sensitivity ($IC_{50}=8,17$), since *in vitro* it would require a lower concentration of tridemorf to achieve the same level of inhibition than a monospore culture with an undefined morphology ($IC_{50}=14,8$), or circular ($IC_{50}=31,9$) or parallel ($IC_{50}=32,1$), the latter having the highest IC_{50} . The proportional distribution showed that the parallel morphology related to a lower sensitivity to tridemorph was present in a higher percentage of individuals (37 %), followed by an undefined morphology (32 %) related to a higher yet intermediate sensitivity. The irregular morphology related to the highest sensitivity to tridemorph was found at a lower proportion (19 %), while a lower percentage of individuals (12 %) presented a circular morphology, characterized by having the second lowest levels of sensitivity, very close to those observed for the parallel morphology (Table 3y).

nal se encontró que los aislamientos de color gris asociados con una menor sensibilidad a tridemorf fueron mayoría en la población y representaron el 56 %, mientras los aislamientos de color blanco y rosa se encontraron a una proporción igual del 22 % (Cuadro 3y). Dentro de los factores al comparar las medias para el del rasgo morfología, se observó que si un cultivo monospórico presentaba un micelio de morfología irregular este individuo estaría significativamente más relacionado con una sensibilidad mayor ($IC_{50}=8,17$), ya que requeriría bajo condiciones *in vitro* de una menor concentración de tridemorf para lograr el mismo nivel de inhibición que un cultivo monospórico de morfología indefinida ($IC_{50}=14,8$), circular ($IC_{50}=31,9$) y paralela ($IC_{50}=32,1$), esta última la de mayor IC_{50} . La distribución proporcional mostró que la morfología paralela asociada a una menor sensibilidad a tridemorf estaba en un mayor porcentaje de individuos (37 %), seguida de la morfología indefinida (32 %) asociada a una sensibilidad mayor pero intermedia. La morfología irregular relacionada con la mayor sensibilidad a tridemorf se encontró a una menor proporción (19 %), mientras un menor porcentaje de individuos (12 %) presentaron morfología circular, que se caracterizó por tener los segundos niveles de sensibilidad más bajos, muy cercanos a los observados para la morfología paralela (Cuadro 3y).

Comportamiento poblacional. Entre los factores no se observaron diferencias significativas (Cuadro 2y), sin embargo dentro los factores al comparar las medias se observaron diferencias significativas para la morfología del micelio. Una población con mayor sensibilidad a tridemorf se relacionó con individuos de una morfología circular ($IC_{50}=1,54$) o irregular ($IC_{50}=1,59$), mientras una sensibilidad menor al tridemorf se relacionó con individuos de una morfología indefinida ($IC_{50}=1,76$) o paralela

Population response. Among the factors there were no significant differences observed (Table 2y), although within the factors, when comparing averages, there were significant differences for the morphology of the mycelium. A population with a higher sensitivity to tridemorf was related to individuals with a circular ($IC_{50}=1,54$) or irregular morphology ($IC_{50}=1,59$), whereas a lower sensitivity to tridemorf was related to individuals with an undefined ($IC_{50}=1,76$) or parallel morphology ($IC_{50}=1,87$). In this case, proportional distribution showed that the parallel morphology related to a lower sensitivity was found in a greater proportion within the population (34%), followed by undefined (25%), irregular (22%), and circular morphologies (19%) (Table 3z).

Length of the Germ Tube and Biomass Production in Relation to Sensitivity to Fungicides

The length reached by the germ tube and the amount of biomass produced *in vitro* and in the absence of the fungicide did not display significant differences with the degree of sensitivity, acquired or inherent, of an individual or a population an individual belongs to, toward piraclostrobin, epoxiconazol, or tridemorf (Table 2z). In other words, a higher or lower IC_{50} had no relation with a longer or shorter length of the germ tube or production of biomass (Table 1).

Length of the Germ Tube in Relation to Biomass Production

In the absence of the fungicide, the length of the germ tube and the amounts of biomass were compared, and no significant differences were found between these two factors (Table 2z), that is to say, a greater or less elongation of the germ tube had no relation with the production of more or less mycelia (Table 1).

($IC_{50}=1,87$). En este caso la distribución proporcional mostró que la morfología paralela asociada con una menor sensibilidad se encontró en una mayor proporción dentro de la población (34 %), seguida de la morfología indefinida (25 %), la irregular (22 %) y la circular (19 %) (Cuadro 3z).

Longitud del tubo germinativo y producción de biomasa en relación a la sensibilidad a fungicidas

La longitud alcanzada por el tubo germinativo y la cantidad de biomasa producida bajo condiciones *in vitro* y en ausencia del fungicida no presentaron diferencias significativas con el grado de sensibilidad adquirido o inherente que tuviera un individuo o la población a la que este individuo pertenecía, hacia piraclostrobin, epoxiconazol o tridemorf (Cuadro 2z). Es decir una mayor o menor IC_{50} no tuvo relación con una mayor o menor longitud del tubo o producción de biomasa (Cuadro 1).

Longitud del tubo germinativo en relación a la producción de biomasa

Cuando en ausencia del fungicida se comparó la longitud del tubo germinativo y la cantidad de biomasa, no se encontraron diferencias significativas entre estos dos factores (Cuadro 2z), es decir una mayor o menor elongación del tubo germinativo no tuvo relación con producir más o menos micelio (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Cuando los resultados fueron analizados en relación a que rasgos fenotípicos predominaron en las poblaciones de *M. fijiensis* en Colombia, se encontró que el color del micelio fue un rasgo que a pesar de aparentemente no estar relacionado con el

DISCUSSION

When the results were analyzed for the predominant phenotypic traits in *M. fijiensis* populations in Colombia, it was found that the color of the mycelium was a trait that, although seemingly unrelated to *fitness*, it was related to representative traits such as the length of the germ tube and biomass production. The color gray was the trait that was present in the most individuals, that is, this would be a trait favored by selection, although the individuals with the highest biomass production or longer germ tubes were not of this color, that is, the gray individuals had increased their number beyond individuals with greater *fitness*. Therefore, there may be external pressures that would be selecting individuals of less *fitness*, and these pressures would be related to the action of fungicides.

The selection exerted by the fungicides would be differential according to the active ingredient and for piraclostrobin it would be causing the individuals with traits related to a higher sensitivity to be the majority (Table 3w), indicating that the individuals with greater opportunities of spreading would be sensitive to piraclostrobin. Alterations in the biological efficiency related to the resistance to QoI fungicides have been reported for other pathogenic fungi (Veloukas *et al.*, 2014; Fernández-Ortuño *et al.*, 2010; Ma, B. y Tredway 2013). Monitoring the time of these traits related to higher or lower sensitivity would help determine if piraclostrobin affects the *fitness* of *M. fijiensis*, and, should this be proven, it would indicate a low risk of this fungicide generating resistance, and not a high risk, as it is currently considered (FRAC, 2014).

For both piraclostrobin and epoxiconazol, sensitive individuals presented exudates, whereas less sensitive individuals did not, indicating

fitness si estuvo relacionado con rasgos representativos como la longitud del tubo germinativo y la producción de biomasa. El color gris fue el rasgo que estuvo presente en una mayor cantidad de individuos es decir que este sería un rasgo favorecido por la selección, sin embargo los individuos de mayor producción de biomasa o mayor tubo germinativo no presentaron este color, es decir los individuos de color gris habrían aumentado su número por encima de individuos de mejor *fitness*. Por lo tanto existirían presiones externas que estarían seleccionando los individuos de menor *fitness* y estas presiones estarían relacionadas a la acción de los fungicidas.

La selección ejercida por los fungicidas sería diferencial según el ingrediente activo y para el piraclostrobin estaría provocando que los individuos con rasgos asociados a una mayor sensibilidad fueran mayoría (Cuadro 3w), indicando que los individuos con mayores oportunidades de propagación serían sensibles a piraclostrobin. Alteraciones en la eficacia biológica asociadas a la resistencia a fungicidas QoI's ya han sido reportadas para otros hongos fitopatógenos (Veloukas *et al.*, 2014; Fernández-Ortuño *et al.*, 2010; Ma, B. y Tredway 2013). Un monitoreo en el tiempo de estos rasgos asociados a una mayor o menor sensibilidad ayudaría a establecer si el piraclostrobin afecta el *fitness* de *M. fijiensis* y de comprobarse indicaría que este fungicida es de bajo riesgo de generar resistencia y no de alto riesgo como se cataloga actualmente (FRAC, 2014).

Se observó que tanto para piraclostrobin como para epoxiconazol los individuos sensibles presentaron exudado mientras los menos sensibles no, indicando una posible relación entre los mecanismos que generan resistencia a estos dos ingredientes activos. La comprobación de estos resultados permitiría establecer si en *M. fijiensis* al igual que en otros hongos fitopatógenos existe resistencia

a possible relation between mechanisms that generate the resistance to these two active ingredients. Should these results be proven, it would help determine if in *M. fijiensis*, as in other pathogenic fungi in plants, there is multiple "Multidrug" resistance (MDR) between fungicides QoI and DMI (Villani and Cox 2014; Kretschmer *et al.*, 2009). Also, it would be a warning on the inconvenience of a spraying program based on the mixture of epoxiconazol and piraclostrobin due to the increase in the selection pressure on individuals tolerant to both active ingredients.

For tridemorf, the traits related to a lower sensitivity were found in a smaller percentage of the population, yet this did not mean that there was a decrease in sensitivity, since individuals from populations subjected to the pressure of fungicides (commercial properties) displayed less sensitivity than those from populations not subjected to the pressure of fungicides (wild properties) (Table 1). The explanation to these results may be related to observations on the morphology trait, where individuals related to a higher sensitivity added up to a similar population percentage to those with a lower sensitivity (Table 3y; z). These results would indicate that within the same population there would be different groups of individuals with variable levels of tolerance, in which no group would dominate in the population. This heterogeneity of sensitivities would imply the inexistence of loss in sensitivity, but it would also imply a constant presence of both sensitive and insensitive individuals.

CONCLUSIONES

Individuals were identified that expressed phenotypic traits related to the level of tolerance to an active ingredient, and this level of tolerance

múltiple “*Multidrug*” (MDR) entre fungicidas QoI y DMI (Villani y Cox 2014; Kretschmer *et al.*, 2009). Además se estaría advirtiendo a cerca de la inconveniencia de un programa de fumigación basado en la mezcla de epoxiconazol y piraclostrobin debido a que se estaría aumentando la presión de selección sobre individuos tolerantes a ambos ingredientes activos.

Para tridemorf los rasgos asociados a una menor sensibilidad se encontraron en un mayor porcentaje de la población, sin embargo esto no significó que existiera pérdida de sensibilidad, debido a que individuos provenientes de poblaciones sometidas a la presión de fungicidas (fincas comerciales) no presentaron menor sensibilidad que aquellos provenientes de poblaciones no sometidas a la presión de fungicidas (fincas silvestre) (Cuadro 1). La explicación a estos resultados puede estar relacionada a lo observado con el rasgo morfología, donde los individuos asociados a una mayor sensibilidad sumaron un porcentaje poblacional similar al de las morfologías asociadas a una menor sensibilidad (Cuadro 3y; z). Estos resultados indicarían que dentro de una misma población existirían diferentes grupos de individuos con variables niveles de tolerancia, en el que ningún grupo tendría el dominio poblacional. Esta heterogeneidad de sensibilidades implicaría la no existencia de pérdida de sensibilidad pero también implicaría una presencia constante tanto de individuos sensibles como tolerantes.

CONCLUSIONES

Se identificaron individuos que expresaron rasgos fenotípicos relacionados con el nivel de tolerancia hacia un ingrediente activo, además este nivel de tolerancia determinaría si los individuos que poseen una serie de rasgos específicos son ma-

would establish if individuals with a series of specific traits are a majority within a population or not. Therefore, a phenotypic characterization by way of monitoring would help establish when the best time would be to apply an active ingredient, depending on whether there is or not, in that moment, a greater or lower number of individuals with traits that express tolerance to that active ingredient.

Some phenotypic traits were found to be related, or in contrast, they were expressed differentially, according to the active ingredient, indicating that the phenotypic characterization could help establish which mixtures of fungicides that still belong to different families, would not lead to cross-resistance.

Acknowledgements

BASF Química staff in Colombia, Eberst de León and Julio Angulo, who have supported the investigation on resistance to fungicides and have granted access to the biological material. This investigation was carried out based on monitoring the sensitivity to fungicides in *M. fijiensis* that the Central Service Lab of the CIB has been carrying out since the year 2008.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

yoría o no en la población. Por lo que una caracterización fenotípica a modo de monitoreo ayudaría a determinar que momento es el más propicio para la aplicación de un ingrediente activo según exista en ese momento un mayor o menor número de individuos con rasgos que expresen tolerancia hacia ese ingrediente activo.

Se encontró que algunos rasgos fenotípicos estaban relacionados o por el contrario se expresaban diferencialmente según el ingrediente activo, indicando que la caracterización fenotípica podría ayudar a determinar que mezclas de fungicidas aún pertenecientes a diferentes familias no conducirían a resistencia cruzada.

**Agradecimientos**

Personal de BASF Química en Colombia, Eberst de León y Julio Angulo, quienes han apoyado la investigación en resistencia a fungicidas y han facilitado el acceso al material biológico. Esta investigación se hizo en base al monitoreo de sensibilidad a fungicidas en *M. fijiensis* que el Laboratorio Central de Servicios de la CIB viene realizando desde el año 2008.

**LITERATURA CITADA**

- A. U. G. U. R. A. Asociación de Bananeros de Colombia, (2015). Coyuntura Bananera Colombiana 2014. Disponible en línea: <http://www.augura.com.co/servicios-gremiales/informacion-economica/>
- Chinn, B. (1997). Effectively Displaying Statistical Results in a High Volume Drug Research Environment Using SAS/GRAPH®. In *Proceedings of the Twenty-Second Annual SUGI Conference* (pp. 819-823). Disponible en línea: <http://www2.sas.com/proceedings/sugi22/INFOVIS/PAPER175.PDF>
- Churchill, A. C. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular plant pathology*, 12(4), 307-328. Doi: 10.1111/J.1364-3703.2010.00672.X
- de Bellaire, L. D. L., Fouré, E., Abadie, C., & Carlier, J. (2010). Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. *Fruits*, 65(06), 327-342. <http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2010034>
- Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., De Vicente, A., & Pérez-García, A. (2010). Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology*, 11(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.2436/20.1501.01.38>
- FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. Summary banana guidelines (2014). Annual meeting minutes. Disponible en línea: <http://www.frac.info/working-group/banana-group/general-use-recommendations>
- FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. Monitoring Methods (2008). [www.frac.info/monitoring-methods](http://www.frac.info/monitoring-methods) (consulta, julio 2015). Disponible en línea: <http://www.frac.info/monitoring-methods>
- Grimmer, M. K., van den Bosch, F., Powers, S. J., & Paveley, N. D. (2015). Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution. *Pest management science*, 71(2), 207-215. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3781>
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., ... & Hahn, M. (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 5(12), e1000696. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>
- Ma, B., & Tredway, L. P. (2013). Induced overexpression of cytochrome P450 sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (CYP51) correlates with sensitivity to demethylation inhibitors (DMIs) in *Sclerotinia homoeocarpa*. *Pest management science*, 69(12), 1369-1378. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3513>
- Pérez Vicente, L. (2006). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra en bananos: estado actual y perspectivas. *Fitosanidad*, 10(1), 55-72. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116158009>
- Van Den Bosch, F., Paveley, N., Shaw, M., Hobbelen, P., & Oliver, R. (2011). The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose?. *Plant Pathology*, 60(4), 597-606. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02439.x>
- Veloukas, T., Kalogeropoulou, P., Markoglou, A. N., & Karaoglanidis, G. S. (2014). Fitness and Competitive Ability of *Botrytis cinerea* Field Isolates with Dual Resistance to SDHI and QoI Fungicides, Associated with Several *sdh B* and the *cyt b G143A* Mutations. *Phytopathology*, 104(4), 347-356. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0208-R>
- Villani, S. M., & Cox, K. D. (2014). Heteroplasmy of the cytochrome b Gene in *Venturia inaequalis* and Its Involvement in Quantitative and Practical Resistance to Trifloxystrobin. *Phytopathology*, 104(9), 945-953. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-06-13-0158-R>