

# EVOLUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE LAS POBLACIONES DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET EN BANANO EN CUBA

Luis Pérez,<sup>1</sup> Alicia Battle,<sup>1</sup> Alexis Hernández,<sup>1</sup> Michel Pérez,<sup>1</sup> Roberto Trujillo,<sup>2</sup> Consuelo Álvarez<sup>3</sup> y Alberto Méndez<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600 c.e.: lperezvicente@sanidadvegetal.cu

<sup>2</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carr. Sub-Planta e/ Circunvalación y Planta Mecánica, Villa Clara

<sup>3</sup> Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal. Carr. Central, Extremo Oeste, Ciego de Ávila

<sup>4</sup> Estación Territorial de Protección de Plantas de Sagua la Grande. Carr. de Santa Clara km 1½

## RESUMEN

Se estudió desde 1991 a 1999 la evolución de la sensibilidad de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Mf) a fungicidas triazoles (test de crecimiento de tubos germinativos de ascósporas) y benzimidazoles (test de germinación de esporas). Los niveles base de sensibilidad a triazoles de las poblaciones al momento de aparición de la sigatoka negra en Cuba estuvieron en el rango de  $CI_{50}$  0,0001 y 0,001 mg/mL (clases 1 a 3 de una escala de 9). Se determinó una disminución cuantitativa de la sensibilidad a los triazoles en el tiempo a partir de 1996 con valores de  $CI_{50}$  0,03 a 0,1  $\mu$ g/mL (clases de 4-6), y en 1998 y 1999 de  $CI_{50}$  0,1 a >1  $\mu$ g/mL (clases de 7 a 9). Esta pérdida de sensibilidad mostró una correlación lineal con el número de tratamientos de IBE (triazoles + morfolinás) realizados y con la disminución del uso de otras clases de fungicidas. La poblaciones de Mf fueron sensibles a 1  $\mu$ g/mL de benomyl. Las líneas base de sensibilidad a estrobilurinas (test de germinación de esporas) de cinco poblaciones de diferentes localidades mostró  $CI_{50}$  entre 0,03 y 0,8  $\mu$ g/mL.

Palabras clave: *Mycosphaerella fijiensis*, *Musa* sp., fungicidas, sensibilidad

## ABSTRACT

The evolution of *Mycosphaerella fijiensis* (Mf) population between 1991 and 1999 to triazole fungicides (ascospore germinative tube growth tests) and benomyl (ascospore germination test) was studied. The base line of sensitivity to triazole in 1991 when Black Sigatoka was reported, was in the range of  $ED_{50}$  between 0.0001 and 0.001 mg/mL (range of classes between 1 and 3 of a maximum value of 9). It was determined a quantitative reduction of sensitivity to triazole on time from 1996 (with values of  $ED_{50}$  from 0.03 to 0.1  $\mu$ g/mL; class from 4 to 6) to 1998 and 1999 ( $ED_{50}$  of 0.1 and >1  $\mu$ g/mL; classes from 7 to 9). The lost of sensibility showed a positive correlation with the number of treatments with triazole + morpholine fungicides and negative with the reduction of use of fungicides belonging to other classes. The (Mf) population in 1998 and 1999 was sensible to 1  $\mu$ g/mL of benomyl. The strobilurine sensibility base line on the base of the  $ED_{50}$  (ascospore germinative tube growth tests) of five populations of different localities was between 0.03 and 0.8  $\mu$ g/mL.

Key words: *Mycosphaerella fijiensis*, *Musa* sp., fungicides, sensibility

## INTRODUCCIÓN

La sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Mf) es la enfermedad más importante de los bananos y plátanos en Cuba. Desde su aparición en el país en 1991 se desarrolló un programa de manejo integrado de la enfermedad con medidas culturales, uso de clones resistentes y pronóstico bioclimático de los tratamientos con fungicidas benzimidazoles, triazoles, morfolinás y ditiocarbamatos en mezclas o emulsiones con aceite mineral, los que han venido siendo utilizados en los últimos años [Pérez, 1997].

Los triazoles son inhibidores de la síntesis de ergosterol de tipo I, que inhiben la enzima 14  $\alpha$  demetilasa, por lo que se han denominado *inhibidores de demetilasa* [DMI, Sisler *et al.*, 1984; Köller y Scheinpflug, 1987]. La resistencia a

DMI es de carácter poligénico, y ha sido vinculada a diferentes mecanismos [Buchenauer, 1995; Sisler, 1996, 1987]. Se han informado en cereales [Brent and Hollomon, 1998] y en bananos [FRAC, 1993 y 1996; Romero y Sutton, 1997] numerosos casos de pérdida de sensibilidad a DMI's en diferentes especies de patógenos.

Las morfolinás son inhibidores de la síntesis de ergosterol de tipo II, cuyos mecanismos de acción han sido relacionados a la inhibición de  $\Delta 7-\Delta 8$  isomerasa y la  $C_{14}$  reductasa [Kerkenaar, 1995]. A pesar de su amplio uso por muchos años en cereales, sólo han sido informados casos aislados de pérdida de sensibilidad [Brown *et al.*, 1991] y no hay antecedentes de pérdida de sensibilidad en *M. fijiensis*.

Los benzimidazoles y tiofanatos se transforman en MBC, el cual se une específicamente con la  $\beta$  tubulina fúngica, inhibiendo la división nuclear en los hongos [Davidse, 1973]. La resistencia a los benzimidazoles en banano está generalizada en Centroamérica [FRAC, 1994, 1996; Romero y Sutton, 1997].

Las estrobilurinas son nuevos ingredientes activos incorporados al manejo de sigatoka negra en Cuba [Pérez *et al.*, 2000], cuyo mecanismo de acción ha sido relacionado a la inhibición del transporte de electrones entre citocromo  $b_1$  y citocromo C [Geier *et al.*, 1992].

El presente estudio estuvo encaminado a determinar los cambios de sensibilidad en el tiempo de las poblaciones de *Mf* a DMI's y benzimidazoles, y a establecer las líneas base de referencia a estrobilurinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 1991 y desde 1995 a 1999 en las empresas bananeras La Cuba, en la provincia de Ciego de Ávila, y Quemados de Güines en Villa Clara. Para conocer la situación base de referencia de las poblaciones en Cuba en 1991, los muestreos se extendieron a las empresas Camagüey y Esmeralda, en la provincia de Camagüey. En todos los casos las muestras fueron tomadas en fincas situadas en diferentes líneas de vuelo, seleccionando 10 plantas adultas no florecidas, donde se tomaron fragmentos entre la octava a la décima hoja abierta con manchas en estado 5-6 portadoras de pseudotecios de *Mf*.

En general, los fragmentos fueron incubados por 48 horas en bolsas con papel de filtro humedecido. Se procedió a fijar los fragmentos en papel de filtro y se sumergieron en agua destilada por 5 min. Los fragmentos fueron colocados en las tapas de placas de Petri que contenían en su

fondo agua-agar (16 g/L de agar de los laboratorios Biocen, en Bejucal, Cuba) envenenado con los diferentes fungicidas, y se dejaron descargar las ascósporas sobre la superficie del agar por una hora.

Para el monitoreo de sensibilidad al propiconazol se utilizaron concentraciones de ingrediente activo de 0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de i.a. Para el benomyl y el azoxystrobin se utilizaron las concentraciones de 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 1; 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Después de la descarga de las ascósporas las placas se incubaron por 48 horas a 25-27°C. Pasado este tiempo se procedió a colocar las placas en una incubadora a menos de 10°C y a evaluar la longitud de los tubos germinativos en el caso de los triazoles, y el porcentaje de ascósporas con germinación normal en el caso del benomyl y el azoxystrobin. Se observaron cien ascósporas por concentración fungicida en todos los casos, y se determinaron los porcentajes de inhibición en relación con el control sin fungicidas. Los datos de inhibición fueron transformados a unidades probit, las concentraciones a logaritmos de concentración, y se calcularon las  $DE_{50}$  para cada muestra mediante el *software* Probit desarrollado en el INISAV para este fin. En el caso de los triazoles los valores de  $DE_{50}$  fueron clasificados en nueve clases (ver *Figs. 1 y 2*).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evolución de la sensibilidad a los triazoles

Los resultados del análisis de las poblaciones de cuatro fincas en 1991 aparecen en la *Tabla 1* y las *Figs. 1 y 2*. Los datos obtenidos fueron tomados como la línea base de referencia para los triazoles al momento de la aparición de la enfermedad. En la empresa Quemados de Güines la enfermedad no estaba presente en 1991.

**Tabla 1. Sensibilidad de cinco poblaciones de *M. fijiensis* a propiconazol**

ECV	Año	Campo	Provincia	$DE_{50}$	$R^2$	Clase (1-9)
Esmeralda	1991	Jiquí	Camagüey	0,0028	0,95	2
Ciego de Ávila	1991	Ciudad	Ciego de Ávila	0,00476	0,93	3
La Cuba	1991	La Carrera	Ciego de Ávila	0,00275	0,96	3
La Cuba	1991	Pista	Ciego de Ávila	0,0004	0,98	2

La variación de la sensibilidad de las poblaciones en las dos empresas en el tiempo aparece en la *Fig. 1*. La evolución de la sensibilidad sigue un patrón típicamente cuantitativo paso a paso. En 1991 las  $DE_{50}$  de las poblaciones de las fincas muestreadas se encontraba en los rangos correspondientes a las clases 2 y 3. En los muestreos iniciados a partir de 1995 y 1996 en la empresa Quemados de Güines se observaron valores de  $DE_{50}$  que se encontraron en el rango de las clases medias, y ya en 1999 algunas de las fincas mostraban valores extremos de pérdida de sensibilidad. En 1997 se observa una dis-

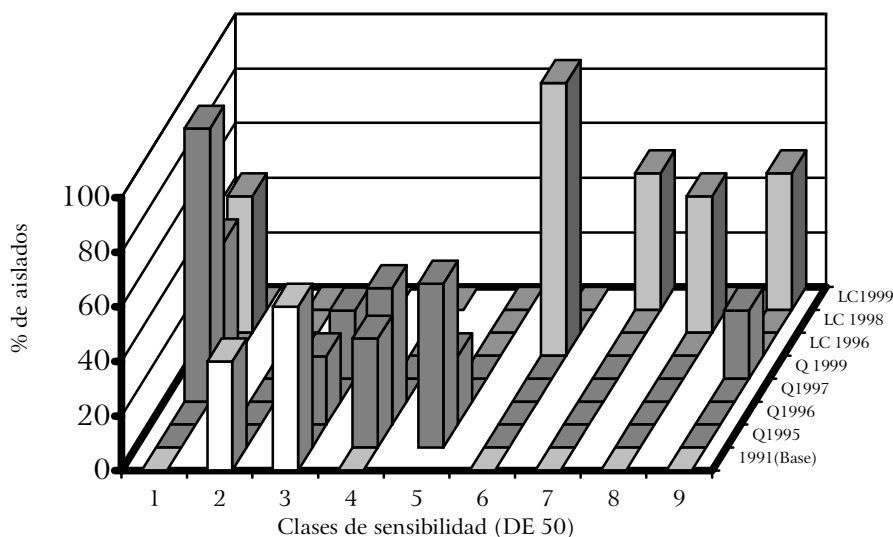
minución de los valores de sensibilidad, quizás determinados por un año muy seco, y se dependió más de tratamientos con fungicidas de contacto.

En La Cuba la situación fue similar. En 1996 se observó un aumento de los valores de  $DE_{50}$  en algunas fincas que se agruparon en las clases medias de sensibilidad. Otras se agruparon en valores bajos. Este año se dependió de los tratamientos con triazoles, y se hizo poca rotación con otros ingredientes activos. En 1999, en cambio, se observaron altas frecuencias de fincas con los valores más

altos de insensibilidad. Fue 1999 anormalmente lluvioso, y se dependió más de tratamientos con triazoles y morfolinás y menos uso de fungicidas de contacto.

La relación entre los valores de HJN durante los meses más favorables a la enfermedad, las clases más frecuentes de sensibilidad y el número de tratamientos con morfolinás

y triazoles para el conjunto de las fincas, aparece en la Fig. 2. Como puede apreciarse, se observa un deterioro del control en campo relacionado con la pérdida de sensibilidad. Al mismo tiempo, esa pérdida mostró en las dos empresas una relación definida con el número total de triazoles + morfolinás anual (Fig. 3).



1 = 0,0001 - 0,0003    3 = 0,001 - 0,003    5 = 0,01 - 0,03    7 = 0,1 - 0,3    9 = >1,0  
 2 = 0,0003 - 0,001    4 = 0,003 - 0,01    6 = 0,03 - 0,1    8 = 0,3 - 1,0

Figura 1. Sensibilidad de las poblaciones de *M. fijiensis* a triazoles propiconazol en Cuba. Líneas base (1991) y situación para las diferentes empresas desde 1995-1999.

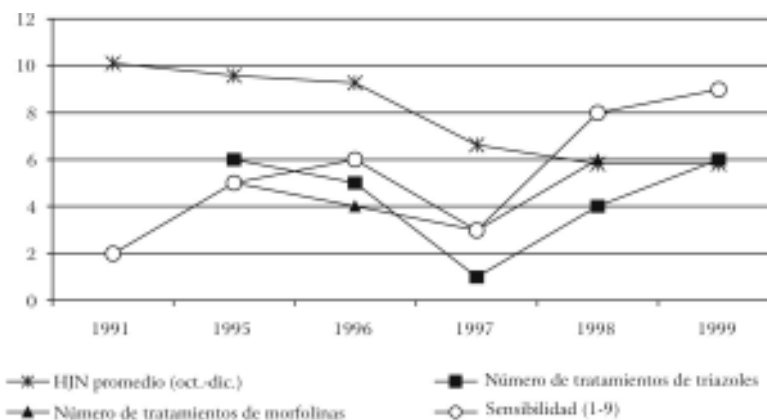


Figura 2. Hoja más joven con necrosis de octubre a diciembre y su relación con la sensibilidad de las poblaciones, y el número de tratamientos con triazoles y morfolinás anualmente.

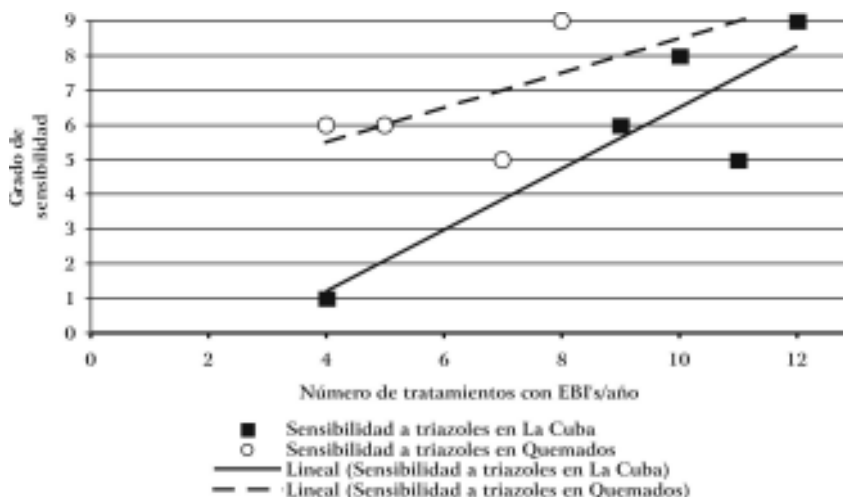


Figura 3. Relación entre el número de tratamientos con EBF's/año y la reducción de sensibilidad de las poblaciones de *M. fijiensis* a fungicidas triazoles en plantaciones de banano de La Cuba y Quemado de Güines.

Hay que decir que estos resultados introducen la pregunta acerca del papel de las morfolinás en el manejo de la resistencia a los triazoles, a pesar de que el número de triazoles utilizados es muy inferior al recomendado en las estrategias de FRAC [FRAC, 1993 y 1996]. Lamentablemente no se realizó monitoreo de las poblaciones a morfolinás, y aunque hay informes de que no existe resistencia cruzada entre triazoles y tridemorph [FRAC, 1994 y 1996], los datos obtenidos sugieren que el uso alternativo de morfolinás y triazoles en la estrategia de manejo de sigatoka negra no disminuye la presión de selección de poblaciones de *Mf* resistentes a triazoles, en contraposición con lo informado por Lorenz *et al.* (1995).

Por otro lado, en Cuba la temporada lluviosa se desarrolla entre mayo y mediados de noviembre. De enero a

abril se realizan entre dos y cuatro tratamientos de fungicidas de contacto, constituyendo períodos libres de inhibidores de ergosterol. No parece haber influencia de estos períodos en la sensibilidad de las poblaciones, siendo mucho más importante el manejo de los inhibidores de síntesis de ergosterol durante la temporada lluviosa, que es cuando mayor cantidad de inóculo está sometida a selección.

#### Evolución de la sensibilidad a benzimidazoles

En la Fig. 4 aparecen las curvas de sensibilidad de monitoreos realizados en la empresa La Cuba. Existe una sensibilidad alta de las poblaciones de *Mf* al benomyl que no ha variado en el tiempo, y existe un ciento por ciento de inhibición a concentraciones de 1 µg/mL.

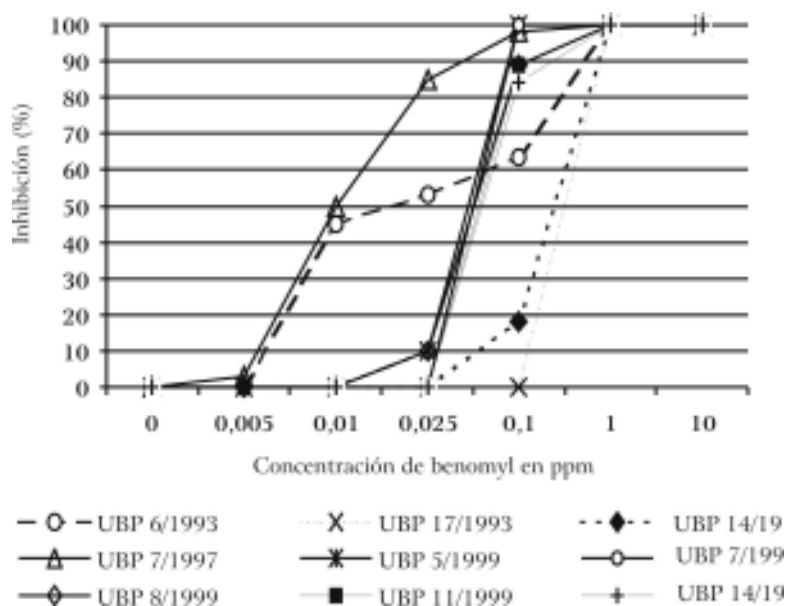


Figura 4. Situación de la sensibilidad de las poblaciones de *M. fijiensis* al benomyl en la empresa La Cuba desde 1993 hasta 1999.

En Cuba se realiza un número reducido de tratamientos con benzimidazoles en mezcla con ditiocarbamatos y aceite a partir de los brotes de resistencia de *M. musicola* al benomyl producidos [Pérez *et al.*, 1985]. Estas poblaciones persistieron estables por más de diez años sin usar este grupo de fungicidas. Han sido introducidos a partir de 1993 en La Cuba cuando se hizo evidente que las poblaciones de *Mf* mostraban una adecuada sensibilidad. En la empresa Quemado de Güines igualmente se retiró por problemas de resistencia el benomyl a mediados de la década del ochenta y se reintrodujo su uso en 1998. Esto brinda la posibilidad de mantener el uso de este ingrediente activo en las estrategias antirresistencia.

### Sensibilidad de cinco poblaciones de *M. fijiensis* al azoxystrobin

En la *Tabla 2* aparece la sensibilidad de cinco poblaciones de *Mf* al azoxystrobin. Se observó una diferencia marcada en la sensibilidad de las poblaciones procedentes de fincas que nunca habían recibido tratamientos con estrobilurinas. Las poblaciones de mayor sensibilidad al azoxystrobin procedían de campos con una alta resistencia a triazoles (La Cuba 17). No obstante, puede considerarse que a nivel de 1 µg/mL hay ciento por ciento de inhibición, por lo que el monitoreo puede establecerse considerando resistentes las poblaciones con  $DE_{50} >$  de 5 µg/mL.

**Tabla 2. Sensibilidad de cinco poblaciones de *M. fijiensis* a azoxystrobin**

Poblaciones	Provincia	DL <sub>50</sub> µg/mL	DL <sub>95</sub> µg/mL	R <sup>2</sup> <sub>(5%)</sub>
Güira 98,1	La Habana	0,8	1,2	0,94
Buena Esperanza	La Habana	0,08	1,2	0,92
Güines	La Habana	0,06	1,0	0,96
La Cuba 15	Ciego de Ávila	0,2	1,8	0,92
La Cuba 17	Ciego de Ávila	0,005	0,12	0,96

## CONCLUSIONES

- Hay una importante pérdida de sensibilidad a triazoles en las poblaciones de *Mf* de Cuba que ha determinado el deterioro de los niveles de control. La pérdida de sensibilidad es independiente del establecimiento de períodos libres de IBE en períodos desfavorables a la enfermedad, y ha estado directamente correlacionada con el número de tratamientos de IBE (triazoles + morfolinás), por lo que es cuestionable el papel del tridemorph en la disminución de la presión de selección a DMI's.
- La sensibilidad de las poblaciones de *Mf* al benomyl es alta y estable en el tiempo. Esto ha estado vinculado a un uso limitado y en cocteles con ditiocarbamatos.
- Las  $DE_{50}$  de cinco poblaciones de *M. fijiensis* al azoxystrobin han mostrado una gran variabilidad. Sin embargo, puede considerarse que a nivel de 1 µg/mL hay ciento por ciento de inhibición, por lo que el monitoreo puede establecerse considerando resistentes las poblaciones con  $DE_{50} >$  de 5 µg/mL.

## REFERENCIAS

- Brown, J. K. M.; S. E. Slater; K. A. See: «Sensitivity of *Erysiphe f. sp. hordei* to Morpholine and Piperidine Fungicides», *Crop Protection* 10:445-454, 1991.
- Buchenauer, H.: «DMI-fungicides-side Effects on the Plant and Problems of Resistance», *Modern Selective Fungicides*, Verlag, New York, 1995, pp. 259-290.
- Davidse, L. C.: «Antimitotic Activity of Methyl Benzimidazol-2-yl-carbamate (MBC) in *Aspergillus nidulans*», *Pestic. Biochem. Physiol.* 3:317-325, 1973.
- FRAC.: «3rd. Meeting of FRAC-SBI Working Group Bananas», Hotel Buena Vista Palace, Orlando, January 21-22, 1993.
- : «Summary and Recommendations of the 4th Meeting of the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), Banana Working Group», BASF, Miami, 25-26 January, 1996.
- Geier B.; H. Schägger, U. Brandt; A. M. Colson; G. Von Jagow: «Point Mutation in Cytochrome b of Yeast Ubihydroquinone: Cytochrome-c Oxidoreductase Causing Myxothiazol Resistance and Facilitated Dissociation of the Iron-sulfur Subunit», *European Journal of Biochemistry* 208 (2):375-380, 1992.
- Kerkenaar, A.: «Mechanism of Action of Cyclic Amine Fungicides: Morpholines and Piperidines», *Modern Selective Fungicides*, Verlag, New York, pp. 185-204, 1995.
- Lorenz, G.; D. Mappes; D. K. Kronshaw: «Tridemorph (Calixin), its Importance in Resistance Management for Sigatoka Control», *Proceedings XI ACORBAT Meeting San José, Costa Rica*, pp. 627-635, 1995.
- Pérez, L.; M. Iglesias; F. Mauri: «Aparición de una raza resistente al benomyl de *Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder agente causal de la sigatoka en plátanos», *Agrotecnia de Cuba* 17 (1):79-98, 1985.
- Pérez, L.: «Black Sigatoka Disease Control in Banana and Plantains Plantations in Cuba. Management of the Disease Based on an Integrated Approach», *INFOMUSA* 7 (1):27-30, 1997.
- Pérez, L.; A. Hernández; R. Trujillo; L. Hernández; M. Pérez: «Efecto del azoxystrobin y el trifloxystrobin en el control de sigatoka negra en bananos y plátanos». XIV ACORBAT, San Juan, Puerto Rico, 2000.

Romero, C.; T. B. Sutton: «Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* Causal Agent of Black Sigatoka of Banana to Propiconazole», *Phytopathology* 87, 96-100, 1997.

Romero, R. A.; B. Sutton: «Characterization of Benomyl Resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, Cause of Black Sigatoka of Banana in Costa Rica», *Plant Disease* 82, 931-934, 1998.

Sisler, H. D.; N. Ragsdale; W. W. Waterfield: «Biochemical Aspects of the Fungitoxic and Growth Regulatory Action of Fenarimol and Other Pyrimidin-5-yl Methanols», *Pesticide Sci.*, 167-176, 1984.

Sisler, H. D.: «Chemistry and Mode of Action of Sterol Biosynthesis Inhibitors. Characteristics of Fungal Resistance to Sterol 14 $\alpha$  Demethylase Inhibitors», 4<sup>th</sup> Meeting of FRAC Banana Working Group, Miami, 25-26 January, 1996.