

RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN POBLACIONES DE *Mycosphaerella fijiensis* DEL SURESTE MEXICANO

FUNGICIDES RESISTANCE ON *Mycosphaerella fijiensis* POPULATIONS OF SOUTHEASTERN MÉXICO

Luciano Martínez-Bolaños¹, Daniel Téliz-Ortiz², J. Concepción Rodríguez-Maciel^{2*}, J. Antonio Mora-Aguilera³, Daniel Nieto-Ángel³, J. Isabel Cortés-Flores², Dimas Mejía-Sánchez¹, Cristian Nava-Díaz³, Gonzalo Silva-Aguayo³

¹Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México, México. ²Fitopatología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ³Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Avenida Vicente Méndez 595, Casilla 537, Chillán, Chile.

RESUMEN

El control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) del banano (*Musa acuminata* Colla AAA) y plátano (*Musa balbisiana* Colla AAB) requiere de numerosas aplicaciones de fungicidas, principalmente de los grupos triazoles que inducen alta presión de selección en poblaciones del patógeno. El objetivo del presente estudio fue determinar la respuesta de cepas de *M. fijiensis* aisladas de plantaciones de banano de Tabasco y Chiapas, México, al propiconazol y tridemorf. Los bioensayos se realizaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA[®]) adicionados con diferentes concentraciones del fungicida. Los medios se inocularon con 100 μ L de una suspensión conidial y fragmentos miceliares del hongo, y se incubaron en oscuridad a 26 °C por 7 d. La concentración efectiva 50 (CE₅₀) y 95 % (CE₉₅) para cada aislamiento se estimó mediante análisis Probit del porcentaje de inhibición del crecimiento relativo del patógeno. Los valores CE₅₀ en propiconazol variaron de 0.0001 a 0.95 mg L⁻¹; y los de CE₉₅ de 0.006 a 12.51 mg L⁻¹. La proporción de resistencia en el nivel CE₉₅ fue superior a 2085 \times , para el aislamiento MF-RmC₂ de la finca Remedios en Teapa, Tabasco. Los valores para CE₅₀ en tridemorf variaron de 0.00001 a 0.002 mg L⁻¹ y los de CE₉₅ de 0.03 a 0.85 mg L⁻¹. La proporción de resistencia a nivel CE₉₅ entre el aislamiento sensible de referencia y el menos susceptible (MF-RcC₅ de la finca el Recreo, Tabasco) fue superior a 28.3 \times . La correlación positiva entre el número de aplicaciones y los valores de CE₅₀ y de CE₉₅ son indicativos de que la presión de selección ejercida en esta plantación generó resistencia al propiconazol.

ABSTRACT

The control of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) of banana (*Musa acuminata* Colla AAA) and (*Musa balbisiana* Colla AAB) requires numerous applications of fungicides, mainly of the triazoles group that impose high selection pressure in populations of this pathogen. The aim of the this study was to determine the response of strains of *Mycosphaerella fijiensis* isolated from banana plantations of Tabasco and Chiapas, México, to propiconazol and tridemorph. The bioassays were carried out in potato dextrose agar (PDA[®]) culture medium added with different concentrations of these fungicides. The media were inoculated with 100 μ L of a conidial suspension and mycelia fragments of the fungus, and incubated in darkness at 26 °C for 7 d. The effective concentration 50 (EC₅₀) and 95 % (EC₉₅) was estimated through Probit analysis of the percentage of inhibition of the relative growth of the pathogen. The EC₅₀ values in propiconazol varied from 0.0001 to 0.95 mg L⁻¹ and those of EC₉₅ from 0.006 to 12.51 mg L⁻¹. The resistance ratio at the level of EC₉₅ was higher than 2085 \times , for the isolate MF-RmC₂ of the Remedios plantation from Teapa, Tabasco. The values for EC₅₀ in tridemorph varied from 0.00001 to 0.002 mg L⁻¹ and those of EC₉₅ from 0.03 to 0.85 mg L⁻¹. The resistance ratio to level EC₉₅ between the sensitive isolate of reference and the least susceptible (MF-RcC₅ of the Recreo plantation, Tabasco) was higher than 28.3 \times . The positive correlation between the number of applications and the values of EC₅₀ and of EC₉₅ are indicative that the selection pressure exerted in this plantation generated resistance to the propiconazol.

* Autor responsable \diamond Author for correspondence.

Recibido: junio, 2012. Aprobado: octubre, 2012.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 46: 707-717. 2012.

Key words: Black Sigota, propiconazol, tridemorph, banana, plantain.

Palabras clave: Sigatoka negra, propiconazol, tridemorf, banana, plátano.

INTRODUCCIÓN

M*ycosphaerella fijiensis* Morelet (Anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) es el agente causal de la Sigatoka negra del banano (*Musa acuminata* Colla AAA) y plátano (*Musa balbisiana* Colla AAB) y es la principal enfermedad del banano (Churchill, 2011). El hongo causa lesiones foliares necróticas que se expanden y destruyen los tejidos, reduciendo la capacidad fotosintética, el volumen de producción e inducen la maduración del fruto (Stover, 1974; Chillet *et al.*, 2009). El control de Sigatoka negra se apoya en el manejo integrado del cultivo que considera mejorar el drenaje del suelo, baja densidad de siembra (2000 plantas ha⁻¹), balance nutricional de N, P y K para inducir resistencia fisiológica, control de maleza, eliminación de tejido enfermo que actúa como fuente de inóculo y combate químico (Marín *et al.*, 2003; Orozco *et al.*, 2008; Kablan *et al.*, 2012). La aspersión profiláctica o terapéutica de fungicidas de contacto o sistémicos es indispensable en el programa de manejo de esta enfermedad, pero aumenta el costo económico y riesgo ambiental (Chin *et al.*, 2001), por lo cual se debe implementar un programa de manejo de la resistencia para reducir el número de aplicaciones. En México, los fungicidas más usados son mancozeb y clorotalonil (preventivos), e ingredientes sistémicos de los grupos benzimidazoles, triazoles, estrobirulinas, y anilopirimidinas (Romero y Sutton, 1997). En Tabasco, México, el manejo químico de la Sigatoka negra requiere 48 a 52 aplicaciones de fungicidas por año, principalmente de mancozeb, propiconazol y tridemorf, por lo cual hay riesgo de desarrollo de resistencia del patógeno a estos agroquímicos (FRAC, 2010).

La resistencia a fungicidas es un factor crítico que limita la eficiencia de los programas de manejo integrado del hongo, al incrementar dosis o frecuencias de aspersiones. Varios estudios muestran la capacidad de *M. fijiensis* para desarrollar resistencia a fungicidas sistémicos de los grupos benzimidazoles (Fullerton y Tracey, 1984; Romero y Sutton, 1998), triazoles (Romero y Sutton, 1997; Pérez, *et al.*, 2003) y estrobirulinas (Sierotzki, *et al.*, 2000; Marín *et al.*, 2003). En contraste, no se ha documentado cambios significativos en la respuesta a morfolinas, a pesar de ser

INTRODUCTION

M*ycosphaerella fijiensis* Morelet (Anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) is the causal agent of black Sigatoka of banana (*Musa acuminata* Colla AAA) and (*Musa balbisiana* Colla AAB) and is the principal disease of banana (Churchill, 2011). The fungus causes necrotic foliar lesions that expand and destroy the tissues, reducing the photosynthetic capacity, production volume and induces the maturation of the fruit (Stover, 1974; Chillet *et al.*, 2009). The control of black Sigatoka is based on the integrated management of the crop which considers improving soil drainage, low crop density (2000 plants ha⁻¹), nutritional balance of N, P and K for inducing physiological resistance, weed control, elimination of diseased tissue that acts as source of inoculum and chemical treatment (Marín *et al.*, 2003; Orozco *et al.*, 2008; Kablan *et al.*, 2012). The prophylactic or therapeutic spraying of contact or systematic fungicides is indispensable in the management program of this disease, but it increases the economic cost and environmental risk (Chin *et al.*, 2001), then, a resistance management program should be applied in order to reduce the number of applications. In México, the most widely used fungicides are mancozeb and chlorotalonyl (preventive), and systematic ingredients of the groups benzimidazoles, triazoles, estrobirulines and anilopirimidines (Romero and Sutton, 1997). In Tabasco, Mexico, the chemical management of black Sigatoka requires from 48 to 52 applications of fungicides per year, mainly of mancozeb, propiconazol and tridemorph; therefore, there is a risk of development of resistance of the pathogen to these agrochemicals (FRAC, 2010).

Resistance to fungicides is a critical factor that limits the efficiency of the programs of integrated management of the fungus, when doses or frequencies of sprayings are increased. Several studies show, the capacity of *M. fijiensis* to develop resistance to systematic fungicides of the groups benzimidazoles (Fullerton and Tracey, 1984; Romero and Sutton, 1998), triazoles (Romero and Sutton, 1997; Pérez *et al.*, 2003) and estrobirulines (Sierotzki *et al.*, 2000; Marín *et al.*, 2003). In contrast, no significant changes have been documented in the response to morfolines, even though it is a fungicide long used for controlling black Sigatoka in the main producing

un fungicida de uso antiguo para controlar Sigatoka negra en las principales zonas productoras de plátano y banano como Costa Rica y Ecuador. En México no hay estudios del grado de sensibilidad de *M. fijiensis* a los grupos toxicológicos de fungicidas (FRAC, 2010). Por tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar la respuesta a los fungicidas propiconazol y tridemorf en poblaciones de *M. fijiensis* que afectan al banano cv Gran Enano en Tabasco y Chiapas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de los aislamientos

El aislamiento de cepas de *M. fijiensis* se realizó del 2009 al 2010 en plantaciones del cv. Gran Enano, Subgrupo Cavendish, en Tabasco y Chiapas, y los sitios de recolección tenían diferentes programas de manejo químico (Cuadro 1). Las cepas se aislaron en el laboratorio de enfermedades de frutales del programa de Fitopatología del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, mediante el método de descarga de ascosporas (Stover, 1976) incubando secciones necróticas de tejidos foliar de 1.0 cm a 26 °C/48 h en oscuridad. Los cultivos mono ascospóricos se obtuvieron en agua-agar al 3 % y se transfirieron a PDA (Bioxon™) para favorecer la esporulación sexual (Romero y Sutton, 1997). Las ascosporas se incubaron cuatro semanas en cajas petri a 26 °C en oscuridad para favorecer crecimiento micelial y producción de conidios (Müller *et al.*, 1997). Los aislamientos mono ascospóricos representativos se conservaron en tubos de ensayo con PDA a 4 °C.

Caracterización cultural y molecular de aislamientos

La verificación de la especie y caracterización morfológica de las ascosporas de aislamientos de *M. fijiensis* se realizó mediante las claves descritas por Hanlin (2000), Crous *et al.* (2007) y Arzanlou *et al.* (2008). Cada aislamiento mono ascospórico se incubó cuatro semanas a 26 °C. El ADN se extrajo del crecimiento micelial con el método AP (Sambrook y Russell, 2001). La integridad del ADN se verificó por electroforesis mediante un gel de agarosa al 1 % a 80 V/40 min en amortiguador TBE teñido con bromuro de etidio. La identificación y confirmación de la especie se realizó con los iniciadores específicos MF137 (5'-GGCGCCCCGGAGGCCGTCTA-3') (Johanson y Jeger, 1993) y universal ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) para amplificar la región interna del transcrito (ITS) del rADN y producir fragmentos de 400 pb (Johanson y Jeger, 1993) en ocho aislamientos representativos. El proceso de PCR se desarrolló en un termociclador Mod 2720

zones of banana such as Costa Rica and Ecuador. In Mexico there are no studies of the degree of sensitivity of *M. fijiensis* to the toxicological groups of fungicides (FRAC, 2010). Therefore, the objective of the present study was to determine the response to the fungicides propiconazol and tridemorph in populations of *M. fijiensis* that affect banana cv Gran Enano in Tabasco and Chiapas.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of the isolates

The isolation of strains of *M. fijiensis* was carried out from 2009 to 2010 in plantations of cv. Gran Enano, Subgroup Cavendish, in Tabasco and Chiapas, and the collection sites had different chemical management programs (Table 1). The strains were isolated in the laboratories of fruit diseases of the Phytopathology Program of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, by means of the ascospore discharge method (Stover, 1976), incubating necrotic sections of foliar tissue of 1.0 cm at 26 °C/48 h in darkness. The mono ascosporic cultures were obtained in agar-agar at 3 % and were transferred to PDA (Bioxon™) to promote sexual sporulation (Romero and Sutton, 1997). The ascospores were incubated during four weeks in Petri dishes at 26 °C in darkness to speed mycelial growth and production of conidia (Müller *et al.*, 1997). The representative mono ascosporic isolates were conserved in test tubes with PDA at 4 °C.

Cultural and molecular characterization of isolates

The verification of the species and morphological characterization of the ascospores of *M. fijiensis* isolates was made by means of the keys described by Hanlin (2000), Crous *et al.* (2007) and Arzanlou *et al.* (2008). Each mono ascosporic isolate was incubated during four weeks at 26 °C. The DNA was extracted from the mycelial growth with the AP method (Sambrook and Russell, 2001). The integrity of the DNA was verified by electrophoresis through an agarose gel at 1 % at 80 V/40 min in a TBE buffer stained with ethidium bromide. The identification and confirmation of the species was made with the specific primers MF137 (5'-GGCGCCCCGGAGGCCGTCTA-3') (Johanson and Jeger, 1993) and universal ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) to amplify the internal transcribed region (ITR) of the rDNA and produce fragments of 400 pb (Johanson y Jeger, 1993) in eight representative isolates. The process of PCR was developed in a Mod 2720 thermocycler (Applied Biosystems®) and the

Cuadro 1. Aislamiento de *Mycosphaerella fijiensis* en plantaciones de banano (*Musa acuminata* Colla AAA 'Cultivar Gran Naime') con diferente manejo químico en regiones productoras de Tabasco y Chiapas, México. Ciclo 2010-11.
Table 1. Isolate of *Mycosphaerella fijiensis* in banana (*Musa acuminata* Colla AAA 'Cultivar Gran Naime') plantations with different chemical management in production regions of Tabasco and Chiapas, México. Cycle 2010-11.

Aislamiento	Finca	Localidad	Ubicación geográfica	Grupos químicos y frecuencia de aspersión contra Sigatoka negra
Cepa sensible	CRUSE	Puyacatengo, Teapa, Tabasco	N 17° 31' 63.1" O 92°55'84.2"	Plantas sin fungicidas. Aisladas de zona bananera.
MIC ₁₃	Mulato	Pichualco, Chiapas.	N 17° 41' 88.2" O 93° 02' 16.5"	36 mancozeb
EbC ₁ , EbC ₄ , EbC ₅	La Elba	I. López Rayón, Teapa, Tabasco	N 17° 38' 63" O 92° 57' 58.7"	48 mancozeb; 2 triazol
JgC ₁ , JgC ₂ , JgC ₃	Jaguar	I. López Rayón, Teapa, Tabasco	N 17° 37' 94.1" O 92° 58' 61.7"	48 mancozeb; 2 estrobirulina; 1 triazol
Rc1C ₃ , Rc1C ₄ , Rc1C ₅ , Rc1C ₆	Recreo	I. López Rayón, Teapa, Tabasco	N 17° 38'58.7" O 92° 57'97.8"	28 mancozeb, 3 clorotalonil, 3 morfolinás; 3 benomilo 48 mancozeb
RmC ₁ , RmC ₂ , RmC ₄ , RmC ₅	Remedios	J. Ma. Mor. y Pavón, Teapa, Tabasco	N 17° 37' 2.7" O 92° 56' 20.7"	3 triazol
MrC ₁ , MrC ₂ , MrC ₃ , MrC ₄	Miranda	I. López Rayón, Teapa, Tabasco	N 17°37'15.7" O 92°57'70.7"	48 mancozeb
AlgC ₁ , AlgC ₃ , AlgC ₄ , AlgC ₅	R. Alegre	Manuel Buelta, Teapa, Tabasco	N 17°37'22.1" O 92°57.780	39 mancozeb; 1 calixin; 1 trifloxistrobin; 4 benomilo
Rita C4	R. Santa Rita	I. López Rayón, Teapa, Tabasco	N 17°37'22.1" O 92°57.780	39 mancozeb; 1 calixin; 1 trifloxistrobin; 4 benomilo

(Applied Biosystems®) y la amplificación se desarrolló con 25 µL de una mezcla con 10 mM de cada iniciador, 10 mM dNTP, 10 x amortiguador de PCR, 50 mM MgCl₂, 0.5 U Taq Polimerasa y 0.5 ng de ADN molde. La rutina de PCR fue una desnaturalización inicial de un ciclo de 95° C/ 5 min, 35 ciclos a 95° C/ 1 min, 57° C/ 1 min y 72° C/ 1 min, con una extensión final de 72° C/ 10 min. Los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador con luz UV. Se empleó un marcador molecular de 100 pb (Invitrogen®).

Concentración de fungicidas y efecto en el crecimiento micelial

Los bioensayos se realizaron con dos fungicidas de uso común para el manejo de Sigatoka negra: Tilt® 250 CE (Propiconazol, concentrado emulsionable, 250 g de i.a. L⁻¹, Syngenta Agro S.A. de C.V.) y Calixin® CE (Tridemorf, concentrado emulsionable

amplification was developed with 25 µL of a mixture with 10 mM of each primer, 10 mM dNTP, 10 x buffer of PCR, 50 mM MgCl₂, 0.5 U Taq Polymerase and 0.5 ng of mold DNA. The PCR routine was an initial denaturalization of a cycle of 95 °C/ 5 min, 35 cycles at 95 °C/ 1 min, 57 °C/ 1 min and 72 °C/ 1 min, with a final extension of 72 °C (10 min). The products were separated by electrophoresis in 1 % agarose gel stained with ethidium bromide and visualized in a transilluminator with UV light. A molecular marker of 100 pb (Invitrogen®) was employed.

Concentration of fungicides and effect in mycelial growth

The bioassays were carried out with two fungicides of common use for the management of black Sigatoka: Tilt® 250 CE (Propiconazol, emulsionable concentrate, 250 g of i.a. L⁻¹, Syngenta Agro S.A. of C.V.) and Calixin® CE (Tridemorph, emulsionable concentrate 860 g of i.a. L⁻¹, Basf S.A. of C.V.). The fungicides were prepared in sterile distilled water in

860 g de i. a. L⁻¹, Basf S. A. de C.V.). Los fungicidas se prepararon en agua destilada estéril en concentraciones de 0.0 (testigo), 0.000135, 0.00135, 0.0135, 0.135, 1.35, 13.5, y 135.00 μg i. a. mL⁻¹. Después se agregaron 10 mL de la concentración respectiva en 190 mL de PDA y vaciaron en cajas petri. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y el experimento completo se repitió dos veces.

El estudio se realizó con 200 cepas de *M. fijiensis*; 25 por finca bananera en ocho plantaciones en Tabasco y Chiapas. El inóculo de cada cepa individual se preparó de colonias de 15 d de edad en PDA (Bioxon). El crecimiento micelial de cada caja se raspó con una varilla de vidrio y se colocó en tubos de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril y 5 μL de Tween 20. La mezcla se homogeneizó con un agitador tipo vortex, se tomó una alícuota de 100 μL de la suspensión conidial y fragmentos miceliares y se dispersó con un asa bacteriológica sobre cajas petri con medio de cultivo PDA y se incubaron 7 d en oscuridad a 26 °C. Después, en cada concentración de fungicida se midió el diámetro (mm) de crecimiento micelial de 100 colonias formadas de fragmentos de micelio o conidios usando microfotografías y el programa Axiovision Carl Zeiss.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar. La concentración efectiva 95 % (CE₉₅), concentración efectiva 50 % (CE₅₀), límites de confianza (LC) y proporción de resistencia (PR) se determinó mediante el procedimiento Probit (SAS Institute, 2003). La proporción de resistencia se obtuvo al dividir el valor de la CE₉₅ de cada cepa fungosa con la del aislamiento sensible de *M. fijiensis*. La respuesta fue significativamente diferente cuando los LC al 95 % no exhibieron traslape (Robertson and Preisler, 1992). La correlación entre la CE₉₅ y frecuencia de aplicaciones en campo de fungicidas sistémicos (Cuadro 1) para el manejo de Sigatoka negra se determinó usando el coeficiente de Pearson (SAS Institute, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de aislamientos

Todos los aislamientos mono ascospóricos obtenidos por descargas de ascosporas a partir de tejidos de hojas de banano con Sigatoka negra se identificaron como *M. fijiensis*. Las ascosporas fueron de coloración hialina, forma globosa y con un septo que forman dos células unidas, una de las cuales siempre fue ligeramente más abultada que la otra. El micelio fue de color blanco y apariencia algodonosa, redonda y de crecimiento lento. El reverso de la caja petri mostró un color negro con bordes blancos.

concentrations of 0.0 (control), 0.000135, 0.00135, 0.0135, 0.135, 1.35, 13.5 and 135.00 μg i.a. mL⁻¹. Then, 10 mL of the respective concentration was added in 190 mL of PDA and emptied into Petri dishes. Each treatment had three replicates and the complete experiment was repeated twice.

The study was carried out with 200 strains of *M. fijiensis*, 25 per banana plantation in eight plantations in Tabasco and Chiapas. The inoculum of each individual strain was prepared in colonies of 15 d of age in PDA (Bioxon). The mycelial growth of each dish was scraped with a glass rod and placed in test tubes with 10 mL of sterile distilled water and 5 μL of Tween 20. The mixture was homogenized with a vortex type agitator, an aliquot of 100 μL of the conidial suspension and mycelia fragments was taken and dispersed with a bacteriological handle over Petri dishes with PDA culture medium and were incubated for 7 d in darkness at 26 °C. Later on, in each concentration of fungicide, the diameter (mm) of mycelial growth was measured of 100 colonies formed from fragments of mycelia or conidia using microphotographs and the program Axiovision Carl Zeiss.

Statistical analysis

The experimental design was completely randomized. The effective concentration 95 % (EC₉₅), effective concentration 50 % (EC₅₀), confidence limits (CL) and resistance ratio (RR) were determined by means of the Probit procedure (SAS Institute, 2003). The resistance ratio was obtained by dividing the value of the EC₉₅ of each fungus strain with that of the sensitive isolate of *M. fijiensis*. The response was significantly different when the CL at 95 % did not overlapped (Robertson and Preisler, 1992). The correlation between the EC₉₅ and the frequency of field applications of systematic fungicides (according to Table 1) for the management of black Sigatoka was determined using the Pearson coefficient (SAS Institute, 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification of isolates

All of the mono ascosporic isolates obtained by discharges of ascospores from tissues of banana leaves with black Sigatoka were identified as *M. fijiensis*. The ascospores were hyaline colored, round shaped and with a septum formed by two united cells, one of which was always slightly more bulky than the other. The mycelium was white in color and of a cotton-like appearance, round and of slow growth. The reverse of the Petri dish displayed a black color with white edges.

Caracterización molecular de aislamientos

La amplificación y secuenciación de la región ITS (Figura 1) del gen rADN de aislamientos representativos presentaron 100 % de similitud a la secuencia documentada por Johanson y Jeger (1993) para *M. fijiensis*.

Efecto del propiconazol y tridemorf en el crecimiento de *M. fijiensis*

Respuesta al propiconazol

La concentración efectiva 50 % (CE_{50}) que presentó *M. fijiensis* a propiconazol fue de 0.0001 a 0.095 mg L⁻¹ y la CE_{95} de 0.006 a 12.51 mg L⁻¹. Los aislamientos de la finca Remedios de Tabasco tuvieron la mayor CE_{95} , con valores de 9.49 a 12.51 mg L⁻¹. Los aislamientos con mayor sensibilidad se presentaron en las fincas sin aplicación del fungicida (Cuadro 2). No hubo superposición de los LC a 95 % de mortalidad, por lo cual se consideraron significativamente diferentes los aislamientos de *M. fijiensis* respecto al aislamiento sensible. La mayor proporción de resistencia (PR) a nivel de CE_{95} se observó en el aislamiento MF-AlgC₃ (> 2085×) (Cuadro 2). Estos

Molecular characterization of isolates

The amplification and sequencing of ITS region (Figure 1) of the gene rDNA of representative isolates presented 100 % similarity to the sequence documented by Johanson and Jeger (1993) for *M. fijiensis*.

Effect of propiconazol and tridemorph on the growth of *M. fijiensis*

Response to propiconazol

The effective concentration 50 % (EC_{50}) presented by *M. fijiensis* to propiconazol was 0.0001 to 0.095 mg L⁻¹ and the EC_{95} of 0.006 to 12.51 mg L⁻¹. The isolates of the Remedios plantation of Tabasco had the highest EC_{95} , with values of 9.49 to 12.51 mg L⁻¹. The isolates with highest sensitivity appeared in the plantations without the application of the fungicide (Table 2). There was no overlapping of the CL to 95 % of mortality, thus the isolates of *M. fijiensis* were considered significantly different with respect to the sensitive isolate. The highest resistance ratio (RR) at the level EC_{95} was observed in the isolate MF-AlgC₃ (> 2085×) (Table 2). These results

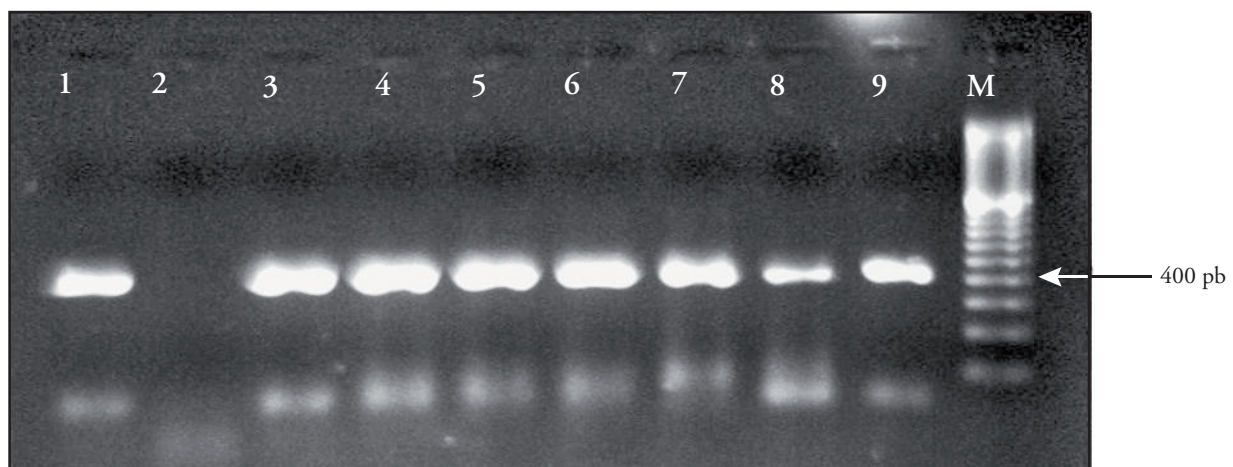


Figura 1. Verificación taxonómica de ocho aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* por amplificación del producto PCR de aproximadamente 400 pb, con iniciadores ITS4-MF137, donde: columna 1 (MF-RmC4), 2 (testigo negativo), 3 (MF-RmC2), 4 (MF-AlgC5), 5 (MF-EbC1), 6 (MF-AlgC4), 7 (MF-AlgC5), 8 (MF-JgC1), 9 (MF-MrC1) y 10 (marcador molecular de 100 pb, Invitrogen®).

Figure 1. Taxonomic verification of eight isolates of *Mycosphaerella fijiensis* by amplification of the PCR product of approximately 400 pb, with primers ITS4-MF137, where: column 1 (MF-RmC4), 2 (negative control), 3 (MF-RmC2), 4 (MF-AlgC5), 5 (MF-EbC1), 6 (MF-AlgC4), 7 (MF-AlgC5), 8 (MF-JgC1), 9 (MF-MrC1) and 10 (molecular marker of 100 pb, Invitrogen®).

Cuadro 2. Sensibilidad al fungicida propiconazol de aislamientos de *M. fijiensis* recolectados en fincas bananeras de Tabasco y Chiapas con diferentes programas de control. Ciclo 2010-2011.**Table 2. Sensitivity to the fungicide propiconazol of isolates of *M. fijiensis* collected in banana plantations of Tabasco and Chiapas with different control programs. Cycle 2010-2011.**

Aislamiento	b±EE [‡]	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)	CE ₉₅ (µg ml ⁻¹)	p > χ ^{2*}	PR ₅₀	PR ₉₅
MF-EbC1	1.78 ± 0.15	0.0015 (0.0012 - 0.0021)	0.56 (0.21 - 2.15)	0.0001	15	93.33
MF-EbC4	3.12 ± 0.27	0.0014 (0.0009 - 0.002)	0.044 (0.025 - 0.096)	0.0001	14	7.33
MF-EbC5	3.28 ± 0.29	0.0063 (0.005 - 0.008)	0.079 (0.051 - 0.145)	0.0001	63	13.17
MF-JgC1	3.46 ± 0.31	0.001 (0.0008 - 0.0015)	0.028 (0.017 - 0.060)	0.0001	110	4.67
MF-JgC2	4.09 ± 0.53	0.0001(0.00003 - 0.0001)	0.0034 (0.002 - 0.010)	0.0001	1.0	0.6
MF-RcC3	1.60 ± 0.18	0.005(0.0032 - 0.0081)	0.116 (0.424 - 0.49)	0.0001	50	193.33
MF-RcC4	4.21 ± 0.41	0.0016(0.0012 - 0.002)	0.0198 (0.0122 - 0.0384)	0.0001	16	3.30
MF-RcC5	5.17 ± 0.51	0.0005 (0.0004 - 0.0007)	0.0058 (0.004 - 0.011)	0.0001	5	0.97
MF-RmC1	1.54 ± 0.18	0.0012 (0.006 - 0.002)	10.53 (4.17 - 21.98)	0.0001	12	1755
MF-RmC2	0.35 ± 0.09	0.051 (0.035 - 0.070)	12.51 (7.01 - 28.89)	0.0001	510	2085
MF-RmC4	0.88 ± 0.09	0.07 (0.02 - 0.14)	9.49 (4.20 - 20.61)	0.0001	700	1581.7
MF-RmC5	0.3 ± 0.09	0.095 (0.07 - 0.13)	10.20 (6.51 - 18.87)	0.0001	950	1700
MF-AlgC1	2.03 ± 0.20	0.006 (0.004 - 0.009)	0.38 (0.18 - 0.99)	0.0001	61	63
MF-AlgC3	5.02 ± 0.48	0.0012 (0.0009 - 0.0015)	0.010 (0.007 - 0.019)	0.0001	12	1.67
MF-AlgC4	2.84 ± 0.28	0.0126 (0.0095 - 0.0167)	0.158 (0.097 - 0.306)	0.0001	126	26.33
MF-AlgC5	2.13 ± 0.20	0.0037 (0.0025 - 0.0054)	0.2786 (0.1344 - 0.75)	0.0001	37	46.43
MF-MrC1	3.39 ± 0.41	0.0001 (0.00008 - 0.0003)	0.011 (0.005 - 0.037)	0.0001	1	1.83
MF-MrC2	4.39 ± 0.43	0.0009 (0.0006 - 0.0012)	0.012 (0.008 - 0.024)	0.0001	9	2.0
MF-MrC3	3.41 ± 0.41	0.0002 (0.00008 - 0.0003)	0.011 (0.005 - 0.036)	0.0001	2	1.83
MF-MrC4	1.99 ± 0.20	0.0008 (0.0004 - 0.001)	0.284 (0.107 - 1.196)	0.0001	8	47.33
MF-RtaC4	4.28 ± 0.41	0.0015 (0.0012 - 0.0021)	0.185 (0.115 - 0.357)	0.0001	15	30.83
Susceptible	3.62 ± 0.55	0.0001 (0.0006 - 0.001)	0.006 (0.0004 - 0.01)	0.0001		

b = valor de la pendiente; [‡] = Error estándar de la pendiente; * = Probabilidad de que la línea log Dosis-Probit ajuste a una línea recta ♦ b=value of the slope; [‡]=Standard error of the slope; *Probability that the line log Dosis-Probit fits to a straight line.

resultados coincidieron con los de Romero y Sutton (1997) quienes caracterizaron la sensibilidad de *M. fijiensis* a propiconazol en Costa Rica, con valores de CE₅₀ entre 0.06 y 0.05 mg L⁻¹ para poblaciones con historial de aplicaciones de propiconazol y 0.008 mg L⁻¹ en susceptibles, con un PR₅₀ de 6.0× y 7.5×. De acuerdo con estos valores, sólo los aislamientos de *M. fijiensis* de la finca Remedios (Teapa, Tabasco), donde se aplicaron tres ciclos de fungicidas por año, pueden considerarse como resistentes a propiconazol mientras que en los restantes, donde se usa mayoritariamente mancozeb (Cuadro 1) son sensibles. Según Pérez *et al.* (2003), los niveles de sensibilidad a triazoles, como propiconazol, de poblaciones de *M. fijiensis* están en un CE₅₀ de 0.0001 a 0.001 mg L⁻¹, aunque la sensibilidad (CE₅₀) disminuye en el tiempo entre 0.03 a 0.1 mg L⁻¹ con una correlación lineal entre la pérdida de sensibilidad y el número de aplicaciones de triazoles. En 42 cepas de *M. fijiensis* provenientes de Ecuador, Brasil, Costa Rica, África y sudeste de Asia hubo una gran variabilidad en la sensibilidad a triazoles,

coincide with those of Romero and Sutton (1997), who characterized the sensitivity of *M. fijiensis* to propiconazol in Costa Rica, with values of EC₅₀ between 0.06 and 0.05 mg L⁻¹ for populations with a history of applications of propiconazol and 0.008 mg L⁻¹ in susceptible populations, with an RP₅₀ of 6.0× and 7.5×. According to these values, only the isolates of *M. fijiensis* of the Remedios plantation (Teapa, Tabasco), where three cycles of fungicide were applied per year, can be considered resistant to propiconazol, whereas in the rest, where mancozeb is mostly used (Table 1), they are sensitive. According to Pérez *et al.* (2003), the level of sensitivity to triazoles, such as propiconazol, of populations of *M. fijiensis* are in an EC₅₀ of 0.0001 to 0.001 mg L⁻¹, although the sensitivity (EC₅₀) diminishes in the time between 0.03 to 0.1 mg L⁻¹ with a linear correlation between the loss of sensitivity and the number of applications of triazoles. In 42 strains of *M. fijiensis* from Ecuador, Brasil, Costa Rica, Africa and Southeast Asia, there was great variability in the sensitivity to triazoles,

Cuadro 3. Sensibilidad al fungicida tridemorf de aislamientos de *M. fijiensis* recolectados en fincas bananeras de Tabasco y Chiapas con diferentes programas de control. Ciclo 2010-2011.

Table 3. Sensitivity to the fungicide tridemorph of isolates of *M. fijiensis* collected in banana plantations of Tabasco and Chiapas with different control programs. Cycle 2010-2011.

Aislamiento	b±EE [‡]	CE ₅₀ (µg ml ⁻¹)	CE ₉₅ (µg ml ⁻¹)	p > χ ^{2*}	PR ₅₀	PR ₉₅
MF-EbC4	2.2 ± 0.2	0.0004 (0.0002 - 0.0006)	0.133 (0.053 - 0.46)	0.0001	4.0	4.43
MF-EbC5	1.9 ± 0.2	0.0001 (0.00007 - 0.0002)	0.301 (0.09 - 0.1.78)	0.0001	1.0	10.03
MF-JgC1	1.9 ± 0.2	0.00006 (0.000001 - 0.00001)	0.14 (0.03 - 1.74)	0.0001	0.1	4.67
MF-JgC2	1.7 ± 0.2	0.002 (0.0015 - 0.004)	0.33 (0.29 - 0.64)	0.0001	20	11.0
MF-RcC3	2.2 ± 0.2	0.0017 (0.001 - 0.003)	0.85 (0.80 - 0.90)	0.0001	17	28.3
MF-RcC4	1.2 ± 0.1	0.00002 (0.000006 - 0.00007)	0.72 (0.05 - 1.78)	0.0001	0.2	24.0
MF-RcC5	1.3 ± 0.1	0.00002 (0.0000007 - 0.00005)	0.20 (0.16 - 0.45)	0.0001	0.2	21.0
MF-RmC1	1.7 ± 0.2	0.00002 (0.000007 - 0.00005)	0.07 (0.017 - 0.51)	0.0001	0.2	2.3
MF-RmC2	1.8 ± 0.2	0.00007 (0.00004 - 0.0001)	0.35 (0.09 - 0.64)	0.0001	0.7	11.7
MF-RmC4	1.9 ± 0.1	0.0002 (0.0001 - 0.0003)	0.35 (0.13 - 0.73)	0.0001	2	11.7
MF-RmC5	1.8 ± 0.2	0.0001 (0.00006 - 0.0002)	0.47 (0.12 - 0.95)	0.0001	1	15.7
MF-AlgC4	3.2 ± 0.3	0.0005 (0.0003 - 0.0008)	0.08 (0.04 - 0.16)	0.0001	5.0	2.7
MF-AlgC5	1.7 ± 0.2	0.0002 (0.0001 - 0.0004)	0.61 (0.16 - 1.12)	0.0001	2.0	20.3
MF-MrC1	2.0 ± 0.2	0.0015 (0.001 - 0.002)	0.30 (0.12 - 0.80)	0.0001	15	10.0
MF-MrC2	1.9 ± 0.2	0.0009 (0.0005 - 0.001)	0.36 (0.13 - 0.74)	0.0001	9	12.0
MF-MrC3	1.9 ± 0.2	0.0001 (0.00006 - 0.0002)	0.36 (0.10 - 0.62)	0.0001	1	12.0
Susceptible	3.8 ± 0.3	0.0001 (0.0001 - 0.0002)	0.006 (0.003 - 0.015)	0.0001		1.0

b = valor de la pendiente; [‡] = Error estándar de la pendiente; * = Probabilidad de que la línea log Dosis-Probit ajuste a una línea recta ♦
 b=value of the slope; [‡]=Standard error of the slope; *Probability that the line log Dosis-Probit fits to a straight line.

con CE₅₀ ≤ 0.095 mg L⁻¹ para poblaciones sensibles, y 0.18 - 0.39 y ≥ 0.90 mg L⁻¹ para tolerantes y resistentes (Cañas *et al.* 2009). Las cepas resistentes se identificaron en países donde se realiza un alto

with EC₅₀ ≤ 0.095 mg L⁻¹ for sensitive populations, and 0.18-0.39 and ≥ 0.90 mg L⁻¹ for tolerant and resistant populations (Cañas *et al.*, 2009). The resistant strains were identified in countries where a

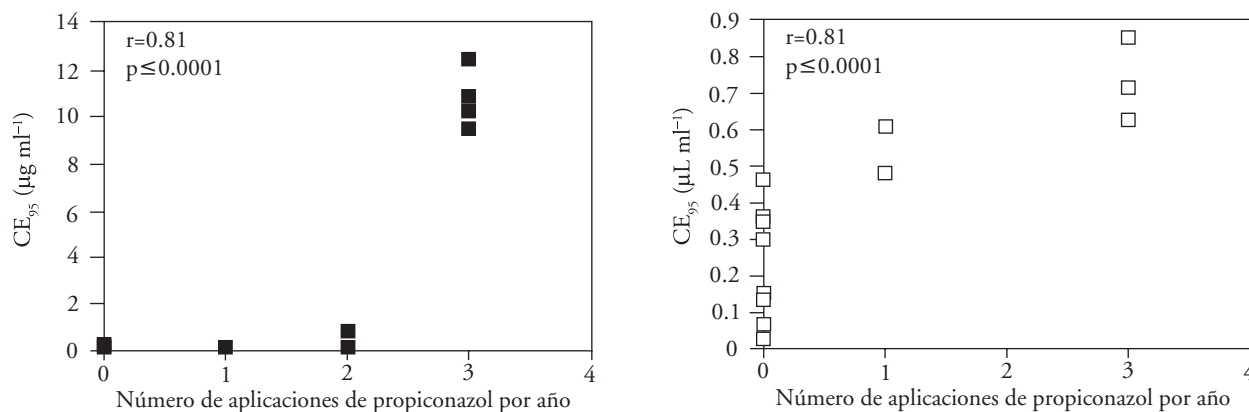


Figura 2. Relación entre el número de aplicaciones de fungicidas contra Sigatoka negra y la concentración efectiva necesaria para reducir el crecimiento micelial al 95 % (CE₉₅) para 23 aislamientos seleccionados de *Mycosphaerella fijiensis*. A) propiconazol, B) tridemorf. r es el valor de la correlación Pearson Prob > |r| suponiendo Ho: Rho=0.

Figure 2. Relationship between the number of applications of fungicides against black Sigatoka, and the effective concentration necessary for reducing the mycelial growth by 95 % (EC₉₅) for 23 selected isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. A) propiconazol, B) tridemorph, r is the value of the Pearson Prob correlation > |r| assuming Ho: Rho=0.

número de aplicaciones de fungicidas por ciclo como Ecuador y Costa Rica (Marín *et al.*, 2003).

Respuesta al tridemorf.

Los valores de la CE_{50} para los aislamientos de *M. fijiensis* fluctuaron entre 0.0001 mg L⁻¹ y 0.002 mg L⁻¹ y la CE_{95} entre 0.006 mg L⁻¹ y 2.0 mg L⁻¹. Los aislamientos de la finca Recreo (MF-RcC₃, MF-RcC₄, MF-RcC₅) y Alegre (MF-AlgC5) presentaron la mayor CE_{95} . Al no registrarse superposición de los límites de confianza a un 95 % de mortalidad, se consideró que existe diferencia estadística entre los aislamientos de *M. fijiensis* y el sensible. La PR a nivel CE_{95} entre el aislamiento sensible y el más tolerante fue superior a 28.3×, y correspondió al aislamiento MF-RcC₃ (Cuadro 3).

Correlación entre variables

La correlación entre el número de aplicaciones de propiconazol en campo y el nivel de sensibilidad CE_{95} de los aislamientos de *M. fijiensis* fue significativa ($r=0.8$; $p\leq 0.0001$). La correlación con el número de aplicaciones y los valores de proporción de resistencia a nivel de CE_{50} y de CE_{95} indican que los aislamientos de *M. fijiensis* de la plantación Remedios son resistentes al propiconazol (Figura 2A). La sensibilidad del hongo al propiconazol muestra una correlación lineal entre la pérdida de sensibilidad y el número de aplicaciones de triazoles (Pérez *et al.*, 2003; Cañas *et al.* 2009), y en *M. graminicola* hay una correlación significativa entre las variaciones genéticas del patógeno y la presión de selección a fungicidas (Ware *et al.*, 2006). Según Cañas *et al.* (2009) y Mullins *et al.* (2011), la resistencia de *M. fijiensis* a propiconazol y fungicidas inhibidores de la desmetilación (DMIs) se correlaciona con uno o más sitios de mutación de la secuencia del gen CYP51 (Y136F, A313G, Y461D, Y463H, Y463N y Y463S) que codifica a la enzima esterol 14 α -demethylasa, esencial en la biosíntesis del ergosterol el cual afecta la fluidez y permeabilidad de las células del hongo que es esencial para la sobrevivencia de la célula (Lepesheva y Waterman, 2004). Respecto a la CE_{95} para tridemorf, los aislamientos mostraron amplia variación en susceptibilidad. Entre el grado sensibilidad del hongo (CE_{95}) y el número de aplicaciones de esta molécula realizadas para el control de *M. fijiensis* hubo una correlación positiva ($r=0.82$)

high number of applications of fungicides are made per cycle such as Ecuador and Costa Rica (Marín *et al.*, 2003).

Response to tridemorph.

The values of the EC_{50} for the isolates of *M. fijiensis* fluctuated between 0.0001 mg L⁻¹ and 0.002 mg L⁻¹ and the EC_{95} between 0.006 mg L⁻¹ and 2.0 mg L⁻¹. The isolates of the Recreo (MF-RcC₃, MF-RcC₄, MF-RcC₅) and Alegre (MF-AlgC5) plantations presented the highest EC_{95} . As there was no overlapping of the confidence limits at 95 % mortality, it was considered that there is a statistical difference between the isolates of *M. fijiensis* and the sensitive one. The RP at level EC_{95} between the sensitive isolate and the most tolerant was higher than 28.3×, and corresponded to the isolate MF-RcC₃ (Table 3).

Correlation between variables

The correlation between the number of applications of propiconazol in the field and the sensitivity level EC_{95} of the isolates of *M. fijiensis* was significant ($r=0.8$; $p\leq 0.0001$). The correlation with the number of applications and the values of proportion of resistance to level EC_{50} and EC_{95} indicate that the isolates of *M. fijiensis* of the Remedios plantation are resistant to propiconazol (Figure 2A). The sensitivity of the fungus to the propiconazol shows a linear correlation between the loss of sensitivity and the number of applications of triazoles (Pérez *et al.*, 2003; Cañas *et al.*, 2009), and in *M. graminicola* there is a significant correlation between the genetic variations of the pathogen and the selection pressure on fungicides (Ware *et al.*, 2006). According to Cañas *et al.* (2009) and Mullins *et al.* (2011), the resistance of *M. fijiensis* to propiconazol and demethylation inhibiting fungicides is correlated to one or more mutation sites of the gene sequence CYP51 (Y136F, A313G, Y461D, Y463H, Y463N and Y463S) which codifies the enzyme sterol 14 α -demethylasa, essential in the biosynthesis of the ergosterol, which affects the fluidity and permeability of the cells of the fungus, which is essential for the survival of the cell (Lepesheva and Waterman, 2004). With respect to the EC_{95} , for tridemorph, the isolates showed wide variation in susceptibility. Between the

(Figura 2B). Tridemorf es un fungicida del grupo de las morfolinas con actividad protectante y sistémica que inhibe la síntesis de ergosterol de tipo II sobre la $\Delta 7\text{-}\Delta 8$ iomerasa y la C_{14} reductasa (Kerkehaar, 1995). No hay cambios significativos de resistencia de *M. fijiensis* a morfolinas, ya que son fungicidas de bajo riesgo de desarrollo de resistencia; además, su movimiento en musáceas es limitado, esencialmente traslaminar (Cronshaw *et al.* 1994). FRAC (2010) indica que tridemorf es un componente importante en las estrategias anti resistencia a benzimidazoles, estrobirulinas y triazoles.

El desarrollo de resistencia a fungicidas en poblaciones de *M. fijiensis* puede estar influenciado por factores genéticos, bioecológicos y operacionales como frecuencia inicial de alelos de resistencia, número y expresividad de los genes, duración de la generación, tasa epidémica de reproducción y uso de fungicidas. En este sentido, cuando se detecta resistencia del patógeno a un fungicida específico, dependiendo de su grado y estabilidad, éste debe restringirse o detener su uso por varios ciclos de cultivo y usar un fungicida alternativo con diferente modo de acción y mecanismos de detoxificación (FRAC, 2010). Un programa fitosanitario exitoso apoyado en los fungicidas inhibidores de la dimetilación, estará en función de mantener un nivel bajo de la fuente de inóculo mediante prácticas culturales (Orozco *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

La correlación entre el número de aplicaciones y los valores de proporción de resistencia tanto a nivel de CE_{50} como de CE_{95} indicaron que los aislamientos de *M. fijiensis* de la plantación Remedios en Teapa, Tabasco, fueron resistentes al propiconazol; sin embargo, los demás aislamientos fueron susceptibles. Todos los aislamientos del hongo fueron susceptibles al tridemorf. Hubo una correlación significativa entre el número de aplicaciones en campo y el nivel de resistencia al propiconazol.

AGRADECIMIENTOS

A los productores de plátano y banano de México, y al CONACYT (FORDECYT No.116886) por el apoyo económico brindado para el desarrollo del presente trabajo de investigación. Se agradece el apoyo de la Línea Prioritaria de Investigación No. 7: Inocuidad,

degree of sensitivity of the fungus (EC_{95}) and the number of applications of this molecule carried out for the control of *M. fijiensis*, there was a positive correlation ($r=0.82$) (Figure 2B). Tridemorph is a fungicide of the group of morpholines with protective and systematic activity that inhibits the synthesis of type II ergosterol over the $\Delta 7\text{-}\Delta 8$ iomerase and the C_{14} reductase (Kerkehaar, 1995). There are no significant changes of resistance of *M. fijiensis* to morfolinas, given that they are fungicides of low risk of developing resistance; furthermore, its movement in Musacea is limited, essentially to translaminate (Cronshaw *et al.*, 1994). FRAC (2010) indicates that tridemorph is an important component in the anti-resistance strategies to benzimidazoles, estrobirulinas and triazoles.

The development of resistance to fungicides in populations of *M. fijiensis* may be influenced by genetic, bioecological and operational factors such as initial frequency of alleles of resistance, number and expressivity of the genes, duration of the generation, epidemic rate of reproduction and use of fungicides. In this sense, when resistance to the pathogen to a specific fungicide is detected, depending on its degree and stability, this should be restricted or its use detained for various crop cycles and uses an alternative fungicide with different degree of action and detoxification mechanisms (FRAC, 2010). A successful phytosanitary program based on demethylation inhibiting fungicides will be a function of maintaining a low level of the source of inoculum through cultural practices (Orozco *et al.*, 2008).

CONCLUSIONS

The correlation between the number of applications and the values of resistance ratio, both at the level of EC_{50} and of EC_{95} indicated that the isolates of *M. fijiensis* of the Remedios plantation in Teapa, Tabasco, were resistant to propiconazol; however, the other isolates were susceptible. All of the isolates of the fungus were susceptible to the tridemorph. There was a significant correlation between the number of applications in the field and the level of resistance to the propiconazol.

—End of the English version—

-----*-----

calidad alimentaria y bioseguridad, del Colegio de Postgraduados.

LITERATURA CITADA

- Arzanlou, M., J. Z. Groenewald, R. A. Ullerton, E. C. A. Abel, J. Carlier, M. F. Zapater, A. Buddenhagen, and P. W. Crous. 2008. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia* 20: 19-37.
- Cañas, G. G. P., V. M. J. Angarita, F. J. M. Restrepo, P. Rodríguez, C. X. Moreno, and R. Arango. 2009. Analysis of the CYP51 gene encoded protein in propiconazole resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manage. Sci.* 65: 892-899.
- Chillet, M., C. Abadie, O. Hubert, Y. Ch. Chilin, and D. B. L. De Lapeyre. 2009. Sigatoka disease reduces the greenlife of bananas. *Crop Protect.* 28: 41-45.
- Chin, K. M., M. Wirz, and D. Laird. 2001. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Dis.* 85: 1264-1270.
- Churchill, A. C. L. 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molec. Plant Pathol.* 12: 307-328.
- Cronshaw, K., G., Lorenz, and D. Mappes. 1994. Monitoring results of *Mycosphaerella fijiensis* to tridemorph. In: Heany S., D. Slawson, D. W. Holloman, M. Smith, P. E. Russell, and D. W. Parry. (eds). *Fungicide Resistance*. British Crop Protection Council Monograph No. 60. pp: 315-321.
- Crous, P. W., U. Braun, and J. Z. Groenewald. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies Mycol.* 58: 1-32.
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2010. Fungicide use guidelines. 10th Meeting Working Group Bananas. Orlando, FLA, USA.
- Fullerton, R. A., and G. M. Tracey. 1984. Tolerance of *Mycosphaerella fijiensis* to benomyl and carbendazim in the Pacific Islands. *Trop. Agric. (Trinidad)*. 61. 133-136.
- Hanlin, R. T. 2000. *Illustrated Genera of Ascomycetes*. Volume 1. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 263 p.
- Johanson, A., and M. J. Jeger. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycol. Res.* 97: 670-674.
- Kablan, L., Lagache, A., Delvaux, B., and Legreve, A. 2012. Silicon reduces black Sigatoka development in banana. *Plant Dis.* 96(2): 273-278.
- Kerkenaar, A. 1995. Mechanism of Action of Cyclic Amines Fungicides: Morpholines and Piperidines. *Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanism of Action*. Verlag, Jena, Alemania. pp: 185-204.
- Lepesheva G., and M. Waterman. 2004. CYP51-the omnipotent P450. *Mol. Cell Endocrinol.* 215: 165-170.
- Marín, D. H., R. A. Romero, M. Guzman, and T. B. Sutton. 2003. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Dis.* 87: 208-222.
- Müller, R., G. C. Pasberg, F. Gauhl, J. Ramser, and G. Kahl. 1997. Oligonucleotide fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigerian *Mycosphaerella fijiensis*. *J. Phytopathol.* 145: 25-30.
- Mullins, J. G. L., J. E. Parker, H. J. Cools, R. C. Togawa, J. A. Lucas, B. A. Fraaije, D. E. Kelly, and S. L. Kelly. 2011. Molecular modeling of emergence of zole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 6(6): e20973. 1-11.
- Orozco S., M., J. Orozco R., O. Pérez Z., G. Manzo S., L. Farías J., y M. Da Silva W. 2008. Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos. *Trop. Plant Pathol.* 33: 189-196.
- Pérez L., A. Batlle, A. Hernández, M. Pérez, R. Trujillo, C. Álvarez, y A. Méndez. 2003. Evolución de la sensibilidad a fungicidas de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en banano en Cuba. *Fitosanidad* 7: 49-54.
- Robertson, J. L., and Preisler, H. K. 1992. *Pesticide Bioassays with Arthropods*. CRC, Boca Raton, 127 p.
- Romero, R. A., and T. B. Sutton. 1997. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology* 87: 96-100.
- Romero, R. A., and T. B. Sutton. 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of Black Sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Dis.* 82: 931-934.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Third edition. 1: 1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- SAS Institute. 2003. *Language guide for personal computer release 9.0 edition* SAS Institute. Cary, North Carolina. USA. 1028 p.
- Sierotzki, H., S. Parisi, U. Steinfeld, I. Tenzer, S. Poirey, and U. Gisi. 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Manage. Sci.* 56: 833-841.
- Stover, R. H. 1974. Effect of measured levels of Sigatoka disease of bananas on fruit quality and leaf senescence. *Trop. Agric.* 51: 531-542.
- Stover, R. H. 1976. Distribution and cultural characteristic of the pathogens causing banana leaf spot. *Trop. Agric. (Trinidad)* 53: 111-114.
- Ware S., T. Diaz, G. Kema, T. Van der Lee, and M. de Waard. 2006. Aspects of sexual reproduction of *Mycosphaerella* species on wheat and barley: genetic studies on specificity, mapping and fungicide resistance. PhD thesis Wageningen University. The Netherlands, ISBN 90-8504-527-4. Chapter 5: 102-104; 114-119.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: Inni, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninski, and T. J. White (eds). *PCR Protocols. A Guide to Method and Applications*. Academic Press, San Diego, CA. pp: 315-322.