

# 01

---

Fecha de presentación: enero, 2021

Fecha de aceptación: marzo, 2021

Fecha de publicación: abril, 2021

## **SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE MICELIOS DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* A FUNGICIDAS COMERCIALES EN *MUSA SP* (AAA)**

### **IN VITRO SENSITIVITY OF *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MYCELIUM TO COMMERCIAL FUNGICIDES IN *MUSA SP* (AAA)**

Abrahan Rodolfo Cervantes Alava<sup>1</sup>

E-mail: [acervantes@utmachala.edu.ec](mailto:acervantes@utmachala.edu.ec)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6223-8661>

Adriana Beatriz Sánchez Urdaneta<sup>2</sup>

E-mail: [usanchez@fa.luz.edu.ve](mailto:usanchez@fa.luz.edu.ve)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3108-0296>

Ciols Beatriz Colmenares de Ortega<sup>2</sup>

E-mail: [ciolysc@fa.luz.edu.ve](mailto:ciolysc@fa.luz.edu.ve)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8545-2959>

José Nicasio Quevedo Guerrero<sup>1</sup>

E-mail: [jquevedo@utmachala.edu.ec](mailto:jquevedo@utmachala.edu.ec)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8974-5628>

<sup>1</sup> Universidad Técnica de Machala. Ecuador.

<sup>2</sup> Universidad del Zulia. Venezuela.

#### Cita sugerida (APA, séptima edición)

Cervantes Alava, A. R., Sánchez Urdaneta, A. B., Colmenares de Ortega, C. B., & Quevedo Guerrero, J. N. (2021). Sensibilidad in vitro de micelios de *Mycosphaerella fijiensis*, a fungicidas comerciales en *Musa Sp* (AAA). *Revista Científica Agroecosistemas*, 9(1), 6-10.

#### RESUMEN

Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), es la enfermedad de mayor importancia en el cultivo de musáceas; disminuye el área foliar en las plantas, su control es con fungicidas a través de aplicaciones aéreas. El manejo de SN, depende de varios dos factores: el monitoreo y la rotación de los grupos químicos, tales como: DMI, Qols, APs, SDHI, guanidinas, N-fenilcarbamatos y multisitios. En el estudio se evaluaron el efecto de cuatro fungicidas, de forma in vitro sobre micelios de *M. fijiensis*, obtenidos en zonas de lindero (AI) y centro (BI), incubados en contenedores de plásticos de 500 mL, desinfectadas en agua destilada más gasa estéril de las haciendas El Playón, Mega Impulso. Los medios PDA solo y PDA más fungicidas, la investigación tuvo como objetivo, analizar la sensibilidad in vitro de los micelios a aplicaciones de fungicidas comerciales después de 10, 20 y 30 dds, en PDA solo y PDA más fungicidas. Los resultados al cuantificar la sensibilidad in vitro hubo una inhibición del 100% de los micelios tanto para T1 (Epoconazole + Tridemorf) a dosis 1:1 ppm; T2 (Espiroxamina + Pirimetanil) a dosis de 1:1 ppm; T3 (Difeconazol + Tridemorf) a dosis de 1:1 ppm y T4 (Fempropimorf + Pirimetanil) a dosis de 5:1 ppm. Los micelios en medio PDA solo, 30 dds en El Playón promediaron de 20,5 mm en AI y para la zona de BI alcanzó 21,4 mm; en Mega Impulso creció 21,1 mm en (BI) y 20,2 mm en (AI).

#### Palabras clave:

Micelios, germinación, zonas, lindero.

#### ABSTRACT

Black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) is the most important disease in the cultivation of musaceae; it reduces the leaf area of plants and is controlled with fungicides through aerial applications. SN management depends on two factors: monitoring and rotation of chemical groups such as: DMIs, Qols, APs, SDHI, guanidines, N-phenylcarbamates and multisites. The study evaluated the effect of four fungicides applied in vitro to mycelia of *M. fijiensis*, collected from (AI) border and (BI) center zones, incubated in 500 mL plastic containers, disinfected in distilled water plus sterile gauze. The samples were taken from the El Playón and Mega Impulso farms. The objective of the research was to analyze the in vitro sensitivity of mycelia to applications of commercial fungicides after 10, 20 and 30 dds, in PDA alone and PDA plus fungicides. The results when quantifying in vitro sensitivity showed 100% inhibition of mycelia for T1 (Epoconazole + Tridemorph) at 1:1 ppm; T2 (Spiroxamine + Pyrimethanil) at 1:1 ppm; T3 (Difeconazole + Tridemorph) at 1:1 ppm and T4 (Fempropimorph + Pyrimethanil) at 5:1 ppm. The mycelia on PDA medium alone, 30 dds in El Playón averaged 20.5 mm in AI and for the BI zone reached 21.4 mm; in Mega Impulso it grew 21.1 mm in (BI) and 20.2 mm in (AI).

#### Keywords:

Mycelia, germination, zones, boundary.

## INTRODUCCIÓN

Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), es una enfermedad que disminuye el área fotosintética en las plantas de banano, provocando baja en la producción, su control es por medio del uso de fungicidas a través de aplicaciones aéreas. Cervantes, et al. (2019), mencionaron que al aplicar los fungicidas, Difeconazole más Fenpropimorf, la hoja 3, presentó menor cantidad de clorofila; mientras que al aplicar Fenpropimorf en mezcla con Ditahne, tuvo mayor contenido, para los factores fungicida, sitios de aplicación (AI- BI) y tiempo de evaluación fueron estadísticamente diferentes para p valor ( $P < 0,00001$ ,  $0,0179$  y  $P < 0,0007$ ), respectivamente.

El uso de fungicidas, ha permitido enfrentar la Sigatoka negra de forma eficaz, este presenta desventajas sobre el ambiente, sumado a la resistencia del patógeno adquirida por la aplicación continuas de ciertos fungicidas sistémicos, como benzimidazoles y más recientemente con la aparición del grupo químico de los triazoles (Cuéllar, et al., 2011). El control químico de SN, depende de varios factores, el monitoreo de las hojas 3 y 4 en la plantación, llevar registro de los datos del preaviso biológico, la evaluación Stover, preaviso meteorológico y revisar el calendario de rotación de los diferentes grupos químicos tales como: inhibidores de demetilación (DMIs), inhibidor mitocondrial de la respiración celular (QoIs), aminas, anilino pirimidinas (APs), inhibidor del proceso de succinato deshidrogenasa (SDHI), guanidinas, N-fenilcarbamatos y fungicidas multisitio o protectantes (Maiguashca, 2018).

Quevedo, et al. (2018), mencionaron que el combate químico es la principal herramienta para el control de SN en banano y que el uso de estos debe seguir los lineamientos de la FRAC y que cada día requiere de más aplicaciones de fungicidas debido a la resistencia de este patógeno. En este sentido; Sepúlveda (2016), realizó aislamientos monospóricos de *M. fijiensis* con relación a su sensibilidad a los fungicidas piraclostrobin, epoxiconazol y tridemorf, los resultados indicaron que los rasgos asociados con una mayor sensibilidad fueron para piraclostrobin y epoxiconazole, para tridemorf se observó una baja y alta sensibilidad.

Manzo, et al. (2012), concluyeron que algunas esporas presentaron sensibilidad *in vitro*, en algunos aisladas a los fungicidas benomyl, propiconazole y azoxistrobin, indicando además la importancia de seguir los lineamientos de la FRAC para evitar la resistencia. Sánchez, et al. (2018), señalan que se realizaron cultivos aislados de *M. fijiensis* en medio PDA, a  $25 \pm 2$  °C con luz constante, para los bioensayos se emplearon micelios monospóricos de 3 semanas de edad, con la finalidad de poseer colonias con características homogéneas en velocidad de crecimiento para disminuir el riesgo de datos erróneo.

Los estudios *in vitro* de *M. fijiensis*, permiten conocer la probabilidad de infección, la velocidad de la colonización del hongo, mutación y esporulación en plantas hospederas (*Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*, 2011). Los organismos que presentan una sensibilidad o insensibilidad reducida a un tóxico se denominan “resistentes”. En este concepto, es necesario distinguir la resistencia natural en la población total de hongos, de la resistencia adquirida por las cepas de una especie que es normalmente sensible. Las propiedades que pueden estudiarse *in vitro* son la germinación, el crecimiento del micelio y la esporulación en medios líquidos y en agar. Pérez (2013), menciona que la susceptibilidad es generalmente la excepción y la resistencia en la regla en aislamientos de SN, obtenidos de plantas de banano Dominico y Hartón, incubados a 27 °C durante 14 días formaron micelios de color gris oscuro a blanco rosado de forma esférica con zonas irregulares y una consistencia algodonosa compacta. Para muestras tomadas en el estado Colima, México, la resistencia de algunas especies de Musa a (*M. fijiensis*), parece estar relacionada más a la re-infección, es decir, la planta activa un mecanismo de defensa, manifestado por la producción de proteínas (Manzo, et al., 2005).

Cervantes, et al. (2020), mencionaron que en muestras de fragmentos de hojas con síntomas de SN, desinfectados en agua destilada estéril en papel filtro estéril, en medio de cultivo (PDA) en cajas de Petri, incubados por 7, 14 y 21 dds, mostraron diferencias estadísticas por efecto de los tratamientos: la germinación y el crecimiento de los micelios alcanzo un valor ( $P < 0,01$ ), a los 21 dds, T5L y T6C (con desinfección agua destilada estéril + 1 minuto de inmersión) presentaron entre 93 y 100% de germinación y el desarrollo de micelios estuvo ente 23 y 24 mm respectivamente.

El objetivo de esta investigación fue analizar la sensibilidad sobre el desarrollo de los micelios de *M. fijiensis*, a las aplicaciones de fungicidas comerciales después de 10, 20 y 30 días, después de ser cultivados *in vitro* en medio nutritivo, PDA sin fungicida y PDA más fungicidas.

El presente trabajo se llevó a cabo desde agosto y septiembre de 2019, en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Técnica de Machala (UTMACH) ubicada en las coordenadas Longitud  $79^{\circ}54'05''$  y Latitud  $3^{\circ}17'16''$  a una altura de 5msnm, en la parroquia el Cambio cantón Machala provincia de El Oro Ecuador.

El estudio de sensibilidad *in vitro*, se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la UTMACH, se aislaron previamente 10 cajas Petri con cepas de micelios obtenidos de *M. fijiensis*, en la zona de linderos y del centro de las haciendas El Playón y Mega Impulso

(5 de lindero, AI y 5 de centro, BI). La metodología para la obtención de micelios desarrollados *in vitro*, fue la descrita por Cervantes, et al. (2020), en su investigación de Evaluación del desarrollo de micelios de *M. fijiensis* Morelet recolectados en el centro y lindero de plantación de Musa sp. (AAA).

El experimento contó con 54 cajas de Petri, todas fueron sembradas bajo las mismas condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar tipo BIOVASE, en el laboratorio de Fitopatología de la FCA-Utmach, los micelios *in vitro* de *M. fijiensis*, en del experimento, fueron los códigos según la hacienda y la zona donde se obtuvo: HPCBI, HPLAI, HMICBI Y HMILAI (figura A-B).

En este bioensayo se utilizaron seis fungicidas comerciales de mayor uso en la campaña de fumigación aérea del 2019, en la provincia de El Oro Ecuador:

- Tundal\*75 CE- (Epoconazole; concentrado emulsionable 75 gL<sup>-1</sup>). Empresa distribuidora, ADAMA.
- Tridetox\*860 OL- (Tridemorph, líquido miscible en aceite 860 gL<sup>-1</sup>). ADAMA.
- Impulse\*80 EC- (Spiroxamina, emulsión concentrada 800 gL<sup>-1</sup>). BAYER.
- Cumpire\* 60 SC- (Pyrimethanil, suspensión concentrada 600 gL<sup>-1</sup>). ADAMA.
- Paladium\* 250 EC- (Difeconazole, concentrado emulsionable 250 gL<sup>-1</sup>) ADAMA.
- Volley\* 880 OL- (Fenpropimorf, líquido miscible en aceite 880 gL<sup>-1</sup>) BASF.

Para este bioensayo las variables respuestas sobre la sensibilidad *in vitro*, se utilizaron una dosis discriminante por cada fungicida (tabla 1). Para medir el volumen a aplicar, se utilizó una micropipeta (marca Transferpette) con capacidad de 1000µl (figura 1, C). Los fungicidas en 190 mL de PDA más 200 mL de agua esterilizada. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones, las cajas se llevaron a un volumen de 20 mL cada una.

Tabla 1. Fungicidas utilizados en el ensayo y dosis discriminante en ppm de cada mezcla.

FUNGICIDAS	DISCRIMINANTES
Epoxiconazole (F1)+ Tridemorf (F2)	F1 (1ppm) más F2 (1pmm)
Expiroxamina (F3) + Pirimetanil (F4)	F3 (1ppm) más F4 (1pmm)
Difeconazole (F5) + Tridemorf (F6)	F5 (1ppm) más F6 (1ppm)
Fenpropimorf (F7) + Piremetanil(F8)	F7 (5ppm) más F8 (1ppm)

## MATERIALES Y MÉTODOS

La determinación del crecimiento o inhibición se hizo de forma visual, y consistió en medir el tamaño o desarrollo del micelio a los 10, 20 y 30 días, medidos con una regla (figura 1, D) por la parte posterior de la base de cada caja Petri, las muestras se incubaron hasta los 30 dds, a temperatura de 27±2 °C,

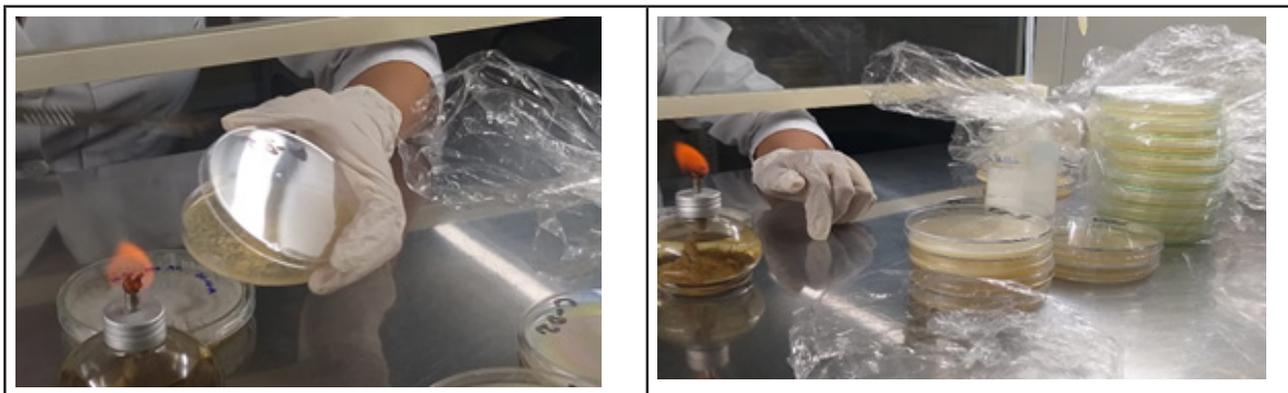




Figura 1. A-B Micelios de *M. fijiensis*, Hacienda El Playón Centro (BI) y Lindero (AI). B. Preparación (micro-pipeta *Transferpette*) de medios envenenados con los fungicidas comerciales. D. Desarrollo de micelios 30 dds.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis propuesto para este bioensayo fue de tipo estadística descriptiva (tabla 2), en donde el 99% de los datos corresponde a un valor de 0 para os 10, 20 y 30 dds, lo que evidencia que hubo una inhibición total del hongo, coincidiendo lo reportado en la investigación de (Cuéllar, et al., 2011), donde los micelios aislados a los 35 dds en medio de cultivo PDA, se conformaron tres grupos de colonia: Grupo A: aislamiento con diámetro entre 13,83 - 16,33 mm (media del grupo 14,68 mm) con el 24%. Grupo B: aislamientos con diámetro entre 12,00 - 13,82 mm (media del grupo 12,81 mm) 50%. Grupo C: aislamientos de colonias con diámetro entre 9,50 - 11,99 mm (media del grupo 10,74 mm) 26 %.

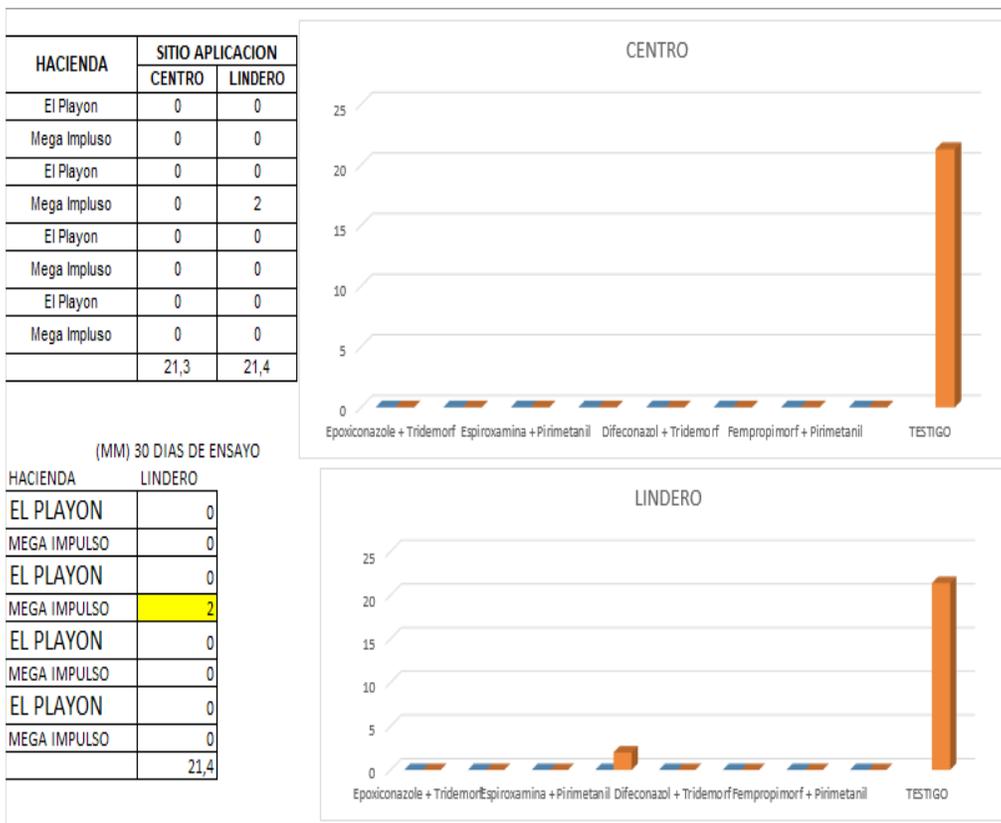


Figura 2. Tamaño de micelios en la zona de Centro (AI) y Lindero (AI) haciendas El Playón y Mega Impluso en el cantón Pasaje, provincia de El Oro.

Los resultados al cuantificar la sensibilidad para El Playón a los 10 días no se observó crecimiento para: T1 (Epoxiconazole + Tridemorf) a dosis (1:1ppm); T2 (Espiroxamina + Pirimetanil) a dosis de (1:1ppm); T3

(Difeconazol + Tridemorf) a dosis de (1:1ppm) y T4 (Fempropimorf + Pirimetanil) a dosis de (5:1ppm) evidenciando una inhibición del 100% del hongo en las zonas (AI-BI), en la hacienda Mega Impulso para la muestra de micelios envenenados en las caja de Petri, en la zona de lindero en el tratamiento 2 (Espiroxamina + Pirimetanil) hubo un crecimiento a los 10 días del 2% (figura 2).

Para micelios en medios nutritivos de cultivo PDA sin fungicida, a los 30 dds, en la hacienda El Playón, en zona linderos (AI) obtuvo un promedio crecimiento de 20,5 mm y para la zona de centro (BI) fue 21,4 mm; mientras que para la hacienda Mega Impulso, los micelios en PDA sin fungicida creció 21,1 mm en las muestras (BI) y 20,2 mm para las muestras de lindero (AI) figura 1 D. Coincidiendo con lo reportado por Manzo, et al. (2018), quienes indicaron que al tomar fragmentos de discos de 6 mm de diámetro de micelios de *M. fijiensis*, de 21 días de edad cultivados en medio apd + eep incubados a temperatura ambiente (25±2 °C, 75±5% de humedad relativa, con 12 h luz/oscura), mostraron crecimiento, alcanzando un promedio de 6.3 mm aproximadamente en 14 dds.

## CONCLUSIONES

El uso de fungicidas comerciales en mezcla física y química, aplicados a las dosis discriminantes respectivas, inhibió el desarrollo in vitro del micelio de *M. fijiensis*, para muestras BI y AI. Haciendas: El Playón y Mega Impulso en El Oro, Ecuador. Las cepas de micelios en El Oro, son sensibles a los productos comerciales aplicados, pero en la mezcla: Espiroxamina más Pirimetanil, en el lindero (2mm), se evidencia algo de tolerancia o pérdida sensibilidad, por la doble exposición de los fungicidas, SN. (*Mycosphaerella sp*) en la zona de LINDEROS. Hay que seguir más estudios de monitoreo sobre la sensibilidad *in vitro*, por la doble exposición en los linderos.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

Cervantes Alava, A. R., Sánchez-Urdaneta, A. B., & Colmenares de Ortega, C. B. (2019). Efecto de las aplicaciones de fungicidas comerciales sobre el contenido de clorofila en el cultivo de banano (Musa AAA). Revista Científica Agroecosistemas, 7(3), 45-49.

Cervantes Alava, A. R., Sánchez-Urdaneta, A. B., Colmenares de Ortega, C. B., & Jaramillo-Aguilar, E. E. (2020). Evaluación del desarrollo de micelios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, recolectados en el centro y lindero en plantación de Musa sp. AAA. Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas, 3(3), 271-276.

Cuéllar, A., Álvarez, E., & Castaño, J. (2011). Evaluación de resistencia de genotipos de plátano y banano a la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Rev. Fac. Nal. Agr., 64(1), 5853-5865.

Maiguashca, F. (2018). Pruebas de hoja simple con productos biorracionales, para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* var. Difformis), en el cultivo de banano Musa acuminata AAA. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Las Fuerzas Armadas.

Manzo, G., Carrillo, H., & Guzmán, S. (2012). Análisis de la sensibilidad in vitro de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra del banano a los fungicidas, Benomyl, Propiconazol y Azoxistrobin. Revista mexicana de fitopatología, 30(1), 81-85.

Manzo, G., Guzmán, S., Rodríguez, C., & James, A. (2005). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su Interacción con Musa Spp. Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA, 23(1), 87-96.

Manzo, G., Sánchez, P., Chan, W., Silva, E., Sánchez, J., & Ayala, M.E. (2018). Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleos contra *Mycosphaerella fijiensis*: un estudio in vitro. *Scientia Fungorum*, 47(1), 13-24.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2011). Manual on fungicides and fungicide resistance monitorin in banana. TCP – SLC- 3402 Project – Development of integrated programmes and action plans for Sigatoka disease management in five countries of the Caribbean. FAO. <http://www.fao.org/3/as125e.pdf>

Pérez, V. (2013). Manual on fungicides and fungicide resistance monitoring in banana. TCP-SLC-3402 Project - Development of Integrated Programmes and Action Plans for Black Sigatoka Disease Management in five countries of the Caribbean. <http://www.fao.org/3/as125e.pdf>

Quevedo, J., Infantes, C., & García, R. (2018). Efecto del uso predominante de fungicidas sistémicos para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el área foliar del banano. Revista Científica Agroecosistema, 6(1), 128-136.

Sánchez, G., Pérez, R., Chan, W., Silva, E., Sánchez, J., & Ayala, M. &. (2018). Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleos contra *Mycosphaerella fijiensis*: un estudio in vitro. *Scientia Fungorum*, 47, 13-24.

Sepúlveda, L. (2016). Caracterización fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su relación con la sensibilidad a fungicidas en Colombia. Rev. Mex. Fitopatol., 34(1), 1-21.