

LÍNEAS BASE DE SENSIBILIDAD DE LAS POBLACIONES DE MYCOSPHAERELLA FIJIIENSIS MORELET DE CUBA, A LOS FUNGICIDAS AZOXYSTROBIN Y TRIFLOXYSTROBIN

Michel Pérez, Rocío Rebullido y Luis Pérez

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; perezmpv@hotmail.com

RESUMEN

Para poder desarrollar monitoreos de resistencia a fungicidas es necesario conocer las líneas base de sensibilidad de las poblaciones locales de los patógenos fungosos a los ingredientes activos. Se realizó un estudio para determinar la línea base de sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Mf) a los derivados de estrobilurinas azoxystrobin (Az) y trifloxystrobin (Tfz), para lo cual, durante los años 2001-2003, se realizaron muestreos de hojas portadoras de necrosis con pseudotecios en las localidades de Güira de Melena y Quivicán en La Habana, y La Cuba en Ciego de Ávila. Se indujo la descarga de ascósporas sobre agar agua envenenados con 0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,5 y 10 µg/mL de ambos ingredientes activos (i.a.), y se determinaron las dosis de efecto 50, 95 y 99 (DE_{50} , DE_{95} y DE_{99}) mediante un análisis de regresión de los probits de los valores de inhibición sobre el log. de la concentración de los i.a. La DE_{50} de ambos fungicidas para la germinación de ascósporas y crecimiento de los tubos germinativos de todas las poblaciones variaron entre 0,01 y 0,03 µg/mL. La dosis mínima inhibitoria (asumida de la DE_{99}) para la germinación de las ascósporas varió entre 0,73 y 1,08 µg./mL i.a. y entre 0,8 y 1,1 µg/mL i.a. para el Az y el Tfz, respectivamente. La concentración mínima inhibitoria de ambos fungicidas para el crecimiento de los tubos germinativos varió entre 1,8 y 2,1 µg/mL i.a. Se concluye que para el monitoreo de la sensibilidad de las poblaciones se pueden utilizar placas envenenadas con 5 µg/mL i.a. de Tfz o Az, que representa entre cinco y diez veces la concentración inhibitoria para la germinación y el crecimiento de los tubos germinativos de las ascósporas. La germinación o crecimiento normal de los tubos de las ascósporas a esta concentración indicaría la presencia de poblaciones resistentes de *M. fijiensis* a estos fungicidas.

Palabras clave: azoxystrobin, trifloxystrobin, sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*, sensibilidad

ABSTRACT

The determination of the local baseline of sensibility of fungal populations to fungicides is mandatory for implementation of systematic monitoring surveillance to assessing the changes of sensibility of fungal plant pathogens to fungicides. To determine the sensibility baseline of Cuban *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Mf) populations to the fungicides azoxystrobin (Az) and trifloxystrobin (Tfz), leaf fragments carrying Black Sigatoka mature leaf spots bearing pseudothecia from fungicide untreated banana plantations of Güira de Melena and Quivican in La Habana province and La Cuba enterprise in Ciego de Avila province were sampled between 2001 to 2003. Ascospore discharges were induced on Petri plates with water agar amended with 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.5 y 10µg/ml concentrations of active ingredient (ai.). The inhibition of ascospore germination and germinative tube growth at each fungicide concentration were assessed and the DE_{50} , 95 and 99 were determined by regression analysis of the probit values of inhibition data over the log of fungicide concentration. DE_{50} for ascospore germination and germinative tube growth for both fungicides were in the range of 0.01 and 0.03µg/ml ai.for all populations studied. The minimal inhibitory concentration (assumed from DE_{99} values) for ascospore germination were in the range from 0.73 to 1.08 ?g/ml ai.for Az and from 0.8 to 1.1 µg/ml ai.for Tfz. The DE_{99} for germinative tube growth were in the range from 1.8 to 2.1 ?g ai. /ml for both fungicides. It is concluded that monitoring of sensibility of Mf populations to these two fungicides should be carry out using Petri dishes with water agar amended with 5 µg./ml ai of Tfz or Az (between five and ten times the inhibitory concentration). A normal germination or growth of ascospores tubes in this concentration is indicatory of the presence of Mf resistant populations to these active ingredients.

Key words: azoxystrobin, trifloxystrobin, black Sigatoka, *Mycosphaerella fijiensis*, sensibility

INTRODUCCIÓN

La raya negra de la hoja sigatoka negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es internacionalmente la enfermedad más importante de los bananos y los plátanos debido a su impacto sobre los costos de producción y los rendimientos de los clones susceptibles [Stover, 1980, Pérez *et al.*, 2002a]. La enfermedad fue encontrada por primera vez en Cuba a finales de 1990 [Vidal, 1992] y

ha tenido un importante impacto sobre los costos de producción y los clones cultivados en el país [Pérez *et al.*, 2002a].

En 1993 se instrumentó un programa de manejo de la enfermedad con el uso de fungicidas sistémicos en tratamientos basados en pronóstico bioclimático [Pérez y Battle, 1993; Pérez, 1997; Pérez *et al.*, 2000a y b]. Han

sido utilizados para el control de la enfermedad fungicidas pertenecientes a diferentes familias químicas, entre los que se encuentran derivados de benzimidazoles, triazoles, morfolinas, carbamatos y más recientemente los derivados de estrobilurinas [Pérez *et al.*, 1993a y b; Pérez *et al.*, 2000c].

M. fijiensis es heterotático [Mourichon y Zapater, 1990] y presenta una gran capacidad de recombinación genética y de selección de poblaciones resistentes que ha sido documentada en el caso de los benzimidazoles [Romero y Sutton, 1998] y de los inhibidores de la síntesis de ergosterol [Buchenauer, 1995; Romero y Sutton, 1997; Pérez *et al.*, 2000c; Sisler, 1996].

Entre los fungicidas más utilizados actualmente para el control de la sigatoka negra se encuentran los derivados del ácido b-metoxiacrílico, que poseen un amplio rango de acción contra diferentes grupos taxonómicos de hongos y diferentes grados de movimiento sistémico [Godwin *et al.*, 1992; FRAC, 1993; FRAC, 1996]. Su modo de acción se basa en el bloqueo de la respiración mitocondrial al bloquear la transferencia de electrones en el citocromo b-c₁ e inhibir la síntesis de ATP [Geier *et al.*, 1992]. Dentro de este grupo se encuentran el azoxystrobin [Godwin *et al.*, 1992] y el trifloxystrobin [Margot *et al.*, 1998].

El azoxystrobin y el trifloxystrobin se unen a los aminoácidos Tyr 273 y Ala 127 [Ziegler *et al.*, 2003] de la proteína del citocromo bc₁. Los estudios de mutagénesis para describir los posibles mecanismos de resistencia a las estrobilurinas que pueden operar, han permitido establecer que la mutación a nivel del G 143A (cambio del aminoácido glicina por alanina en la posición 143) tiene la mayor importancia práctica [Sierotzki *et al.*, 2000a y b; Heaney *et al.*, 2000; Kuck y Mehl, 2003]. Pérez *et al.* (2002b) informaron de la eficacia del trifloxystrobin y el azoxystrobin en el control de poblaciones de *M. fijiensis* sensibles y resistentes a inhibidores de la síntesis de ergosterol en Cuba. Estos ingredientes activos son, por tanto, de alto riesgo de selección de resistencia y de hecho han sido informados casos de selección de poblaciones con sensibilidad y pérdida de control en campo [Wirz y Chin, 2000].

El presente estudio está encaminado a determinar las líneas base de sensibilidad para ajustar los sistemas de monitoreo de la variación de la sensibilidad en el tiempo de las poblaciones de *M. fijiensis* al azoxystrobin y el trifloxystrobin en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del estudio se tomaron muestras de campos –no tratados con fungicidas contra sigatoka negra– de Gran Enano en Ciudad de La Habana (CHGE); FHIA 18 (GMF18-1 y GMF18-2), Gran Enano (GMGE) en del Jardín Clonal de Güira de Melena; de FHIA 18 (QF18-1 y QF18-2) y FHIA 20 (QF20) en el municipio

de Quivicán, de la provincia de La Habana, y de FHIA 18 de la Cuba en Ciego de Ávila (CAF18), desde el 2001 al 2003. En todos los casos se seleccionaron 10 plantas adultas no florecidas, de las cuales se tomaron fragmentos de la octava a la décima hoja abierta, con manchas en estado 5-6, portadoras de pseudotecios de *M. fijiensis*.

Los fragmentos fueron fijados en papel de filtro e incubados durante 48 horas en bolsas con papel de filtro humedecido. Posteriormente se sumergieron en agua destilada por 5 minutos y se colocaron en las tapas de placas de Petri de 9 cm que contenían en su fondo agua agar (16g/L de agar de los Laboratorios BIOCEN, Bejucal, Cuba) envenenado a las concentraciones de 0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,5 y 10 µg/mL de Az y Tzf, y se dejaron descargar las ascósporas por una hora. Las placas se incubaron durante 48 horas a 25-27°C. Pasadas las 48 horas se procedió a colocar las placas en refrigeración a menos de 10°C para detener cualquier germinación o crecimiento posterior de los tubos y a evaluar el porcentaje de ascósporas con germinación normal y la longitud de los tubos germinativos. Se observaron 100 ascósporas por concentración de 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 y las concentraciones a logaritmos de concentración, y se calcularon las dosis inhibitorias (DE₅₀ y DE₉₅) para cada muestra mediante el software PROBIT desarrollado en el INISAV para este fin.

Se utilizó el conjunto de los datos de las mediciones de la inhibición del tubo germinativo de las ascósporas de todos los experimentos, con los diferentes aislados de las poblaciones muestreadas de *M. fijiensis* (CAF18, QF20, CHGE, GMF18-1, GMPR, GMGE, GMF18, GMGE) para determinar las frecuencias de ascósporas por rangos de inhibición de los tubos germinativos. Se diferenciaron las clases por rangos de inhibición como:

Clase	Inhibición (%)
1	0 a 10
2	10,1 a 30
3	30,1 a 50
4,	50,1 a 70
5	> 70

Para determinar la frecuencia de las esporas que correspondían a cada clase, se calcularon los límites máximos y mínimos en µg que representaban los porcentajes de inhibición en relación con los testigos correspondientes no tratados en cada ensayo. Con los datos obtenidos se realizó un gráfico de distribución de frecuencias de inhibición para el conjunto de todas las poblaciones estudiadas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* aparecen los diferentes aislados utilizados para los tests de inhibición de la germinación y de

inhibición del crecimiento de los tubos germinativos. En la Fig. 1 se muestra la relación de las concentraciones de azoxystrobin frente a la inhibición de la germinación de las ascósporas de diferentes poblaciones de *M. fijiensis*. La inhibición cercana al ciento

por ciento para el aislado CHGE se alcanzó a una concentración de 0,05 $\mu\text{g/mL}$, por lo que resultó ser altamente sensible. A la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo en todos los casos una inhibición total de la germinación de las ascósporas.

Tabla 1. Aislados utilizados para la determinación de las líneas de sensibilidad

Aislado	Clon	Procedencia
CHGE	Gran Enano	Ciudad de La Habana
GMF18-1	FHIA 18	Güira de Melena (La Habana)
GMF18-2	FHIA 18	Güira de Melena (La Habana)
QF18-1	FHIA 18	Quivicán (La Habana)
QF18-2	FHIA 18	Quivicán (La Habana)
QF20	FHIA 20	Quivicán (La Habana)
CAF18	FHIA 18	Ciego de Ávila
GMPR	Parecido al Rey	Güira de Melena (La Habana)
GMGE	Gran Enano	Güira de Melena (La Habana)

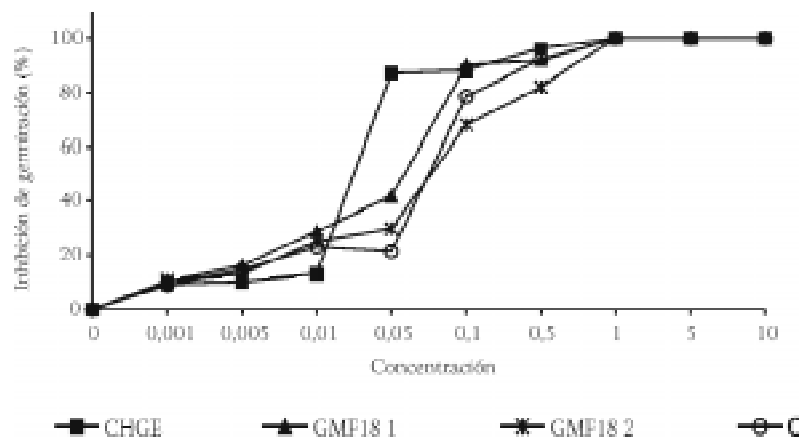


Figura 1. Curvas de inhibición de la germinación de las ascósporas de *M. fijiensis* en función de la concentración de azoxystrobin.

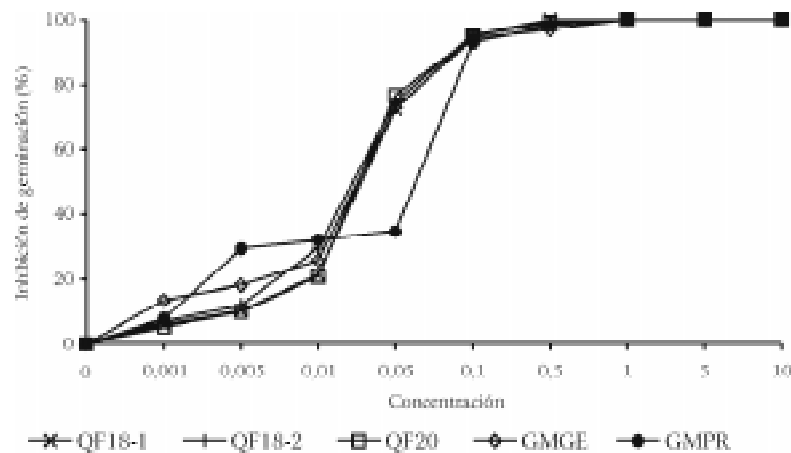


Figura 2. Curvas de la inhibición de la germinación de las ascósporas de *M. fijiensis* en función de la concentración de trifloxytrobin.

En la Fig. 2 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de trifloxystrobin con respecto a la germinación de las ascósporas. La concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de trifloxystrobin produjo una inhibición superior al 90% de la germinación de las ascósporas de todas las poblaciones. La sensibilidad de nueve aislados de *M. fijiensis* al azoxystrobin y trifloxystrobin que se presentan en la Tabla 2 demuestra que el aislado con mayor sensibilidad al azoxystrobin fue el procedente de Ciudad de La Habana (CHGE), mientras que para el trifloxystrobin el aislado de Quivicán QF18 fue el más sensible. No se observaron marcadas diferencias entre las diferentes poblaciones analizadas.

Las Figs. 3 y 4 muestran el efecto de la concentración de Az y Tfz en relación con la germinación de las ascósporas. La concentración de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de Az (Fig. 3) produjo una inhibición total del crecimiento de los tubos germinativos. El aislado que mayor sensibilidad mostró fue el CHGE procedente de Ciudad de La Habana. No se observaron diferencias marcadas de los valores de inhibición del crecimiento del tubo germinativo de los diferentes aislados frente al trifloxystrobin (Fig. 4). El aislado GMF18-1 mostró valores de inhibición del crecimiento del tubo germinativo semejantes a los observados en el test de inhibición de la germinación de las ascósporas.

La sensibilidad de nueve aislados de *M. fijiensis* al azoxystrobin y trifloxystrobin en el test de inhibición del crecimiento de los tubos germinativos de las ascósporas

aparece en la Tabla 3. Las DE_{50} variaron entre 0,02 y 0,03 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las DE_{99} variaron entre 1,86 y 2,11 $\mu\text{g/mL}$. Esto indica que los aislados de todas las poblaciones mostraron una sensibilidad muy similar al Az y el Tfz. En las Figs. 5 y 6 se observa la distribución de las frecuencias de inhibición del crecimiento de los tubos germinativos de las ascósporas de *M. fijiensis* para el azoxystrobin y trifloxystrobin respectivamente. A partir de la concentración de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, todas las poblaciones mostraron las mayores frecuencias de ascósporas en las clases superiores de inhibición. Estos resultados concuerdan con los resultados para la germinación de ascósporas. Se puede apreciar en ambas figuras que a las concentraciones de 0,01 y 0,05 la totalidad de las ascósporas se encontraban en las clases intermedias de inhibición, lo que indica que la DE_{50} se encuentra en este rango de concentraciones.

La concentración inhibitoria de la germinación de las ascósporas estuvo entre 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ para ambos ingredientes activos. Para el crecimiento de los tubos germinativos la concentración mínima inhibitoria estuvo en el rango de 0,1 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Para el monitoreo a gran escala de la sensibilidad de las poblaciones a *M. fijiensis* pueden utilizarse solo placas con 5 $\mu\text{g/mL}$ de Az o de Tfz, que representa la existencia de un factor de resistencia en la población variable entre cinco y diez veces la concentración inhibitoria. La germinación o crecimiento normal a esta concentración implicaría la existencia de pérdida de sensibilidad a estos ingredientes activos en la población.

Tabla 2. Sensibilidad de las poblaciones DE_{50} y DE_{95} del azoxystrobin y trifloxystrobin sobre la germinación de las ascósporas de *Mf*

Fungicida	Aislado	DE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	DE_{95} ($\mu\text{g/mL}$)	DE_{99} ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
Azoxystrobin	CHGE	0,01	0,30	1,08	0,87
	GMF18-1	0,01	0,39	0,73	0,88
	GMF18-2	0,02	0,60	0,76	0,86
	CAF18	0,01	0,41	0,85	0,86
Trifloxystrobin	QF18-1	0,02	0,26	0,76	0,85
	QF18-2	0,03	0,29	0,88	0,93
	QF20	0,03	0,30	1,19	0,94
	GMGE	0,01	0,28	1,02	0,92
	GMPR	0,01	0,31	1,11	0,91

Líneas base de sensibilidad.....

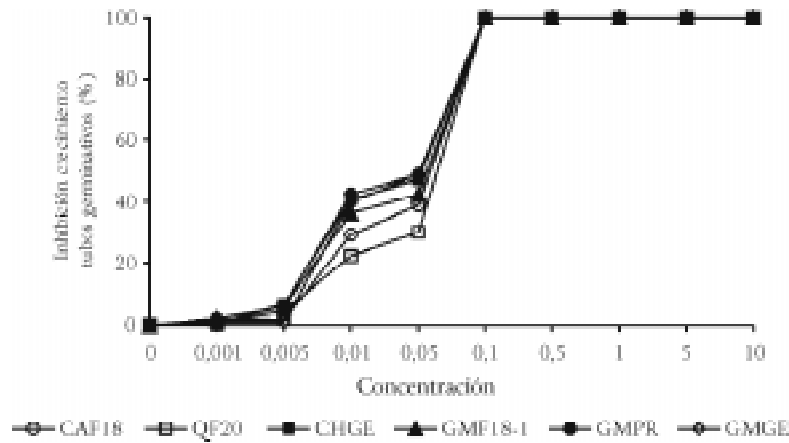


Figura 3. Relación entre la concentración de trifloxystrobin y la inhibición del crecimiento de los tubos germinativos al azoxystrobin.

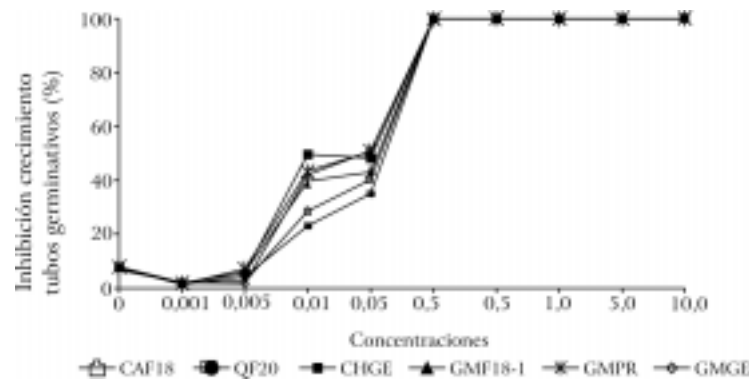


Figura 4. Relación entre la concentración de trifloxystrobin y la inhibición del crecimiento de los tubos germinativos al trifloxystrobin.

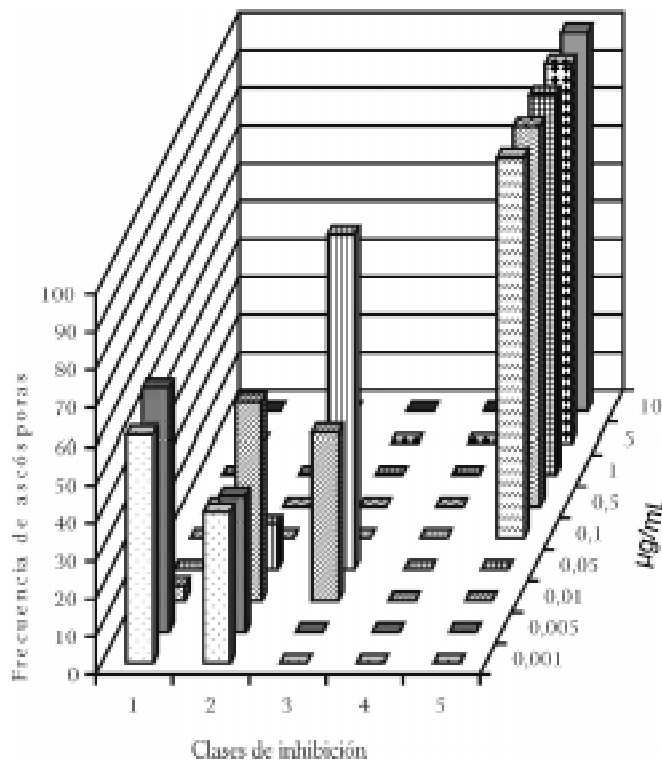


Figura 5. Distribuciones de frecuencias de inhibición del desarrollo de los tubos germinativos de las ascósporas de *M. fijiensis* para el azoxystrobin.

Clases: 1(0-10%), 2 (10,1-30%), 3 (30,1-50%), 4 (50,1-70%), 5 (> 70%)

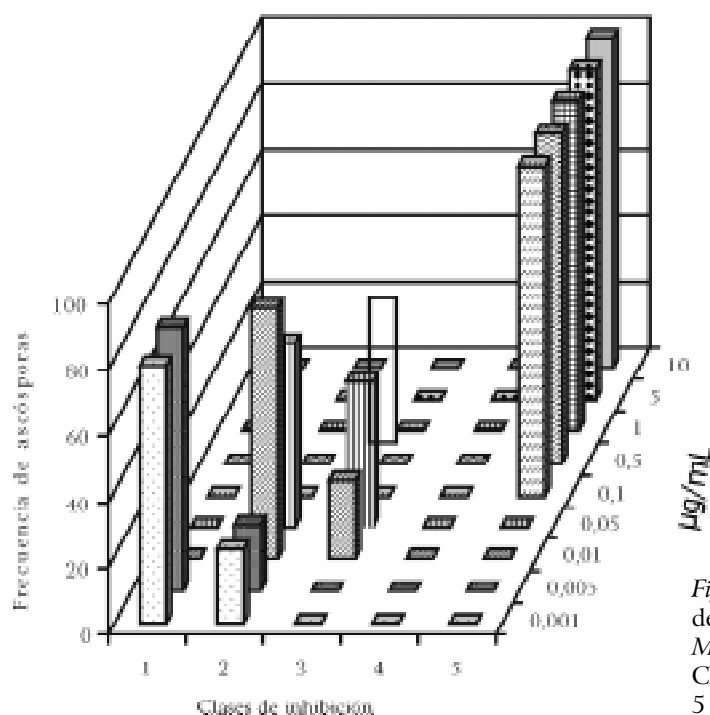


Figura 6. Distribuciones de frecuencias de inhibición del desarrollo de los tubos germinativos de las ascósporas de *M. fijiensis* para el trifloxystrobin. Clases: 1 (0-10%), 2 (10,1-30%), 3 (30,1-50%), 4 (50,1-70%), 5 (> 70%).

CONCLUSIONES

- Las DE_{50} del azoxystrobin y el trifloxystrobin sobre la germinación y el crecimiento de los tubos germinativos de las ascósporas de diferentes poblaciones de *M. fijiensis* de campos no tratados con fungicidas varió entre 0,01 y 0,03 $\mu\text{g/mL}$. La germinación de las ascósporas y el crecimiento de los tubos germinativos fueron totalmente inhibidos a concentraciones entre 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$.
- La concentración inhibitoria del crecimiento de los tubos germinativos del azoxystrobin y el trifloxystrobin fue variable entre 0,1 y 0,5 $\mu\text{g/mL}$.
- La dosis mínima inhibitoria (DE_{99}) para el test de germinación de las ascósporas para el Az varió entre 0,73 y 1,08 $\mu\text{g/mL}$, y para el Tfz entre 0,8 y 1,1 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en el test de crecimiento del tubo germinativo estuvo en el rango de 1,8 y 2,0 $\mu\text{g/mL}$ para el Az, y entre 1,9 y 2,1 $\mu\text{g/mL}$ para el Tfz.
- El monitoreo de la sensibilidad de las poblaciones de *M. fijiensis* al azoxystrobin y trifloxystrobin, puede establecerse con la utilización de placas de agar agua envenenadas con 5 $\mu\text{g/mL}$ de los ingredientes activos, que representa entre cinco y diez veces la concentración inhibitoria de la germinación y el crecimiento de los tubos germinativos respectivamente. La presencia de poblaciones con germinación o crecimiento de los tubos germinativos normales a esta concentración indicaría la pérdida de sensibilidad a estos ingredientes activos.

REFERENCIAS

Buchenauer, H.: «DMI-Fungicides-Side Effects on the Plant and Problems of Resistance», *Modern Selective Fungicides*, Verlag, New York, 1995, pp. 259-290.

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. Schnagger; U. Brandt; A. M. Colson; G. Von Jagow: «Point Mutation in Cytochrome b of Yeast Ubiquinol: Cytochrome-c Oxidoreductase Causing Myxothiazol Resistance and Facilitated Dissociation of the Iron-Sulfur Subunit», *European Journal of Biochemistry* 208 (2):375-380, 1992.

Godwin, J. R.; J. M. Anthony; J. M. Clough; C. R. A. Godfrey: «ICI 5504, a Novel, Broad Spectrum Systemic (Beta-Methoxyacrylate Fungicide)», *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference on Pest and Diseases*, vol. 1:435-442, 1992.

Heaney, S. P.; A. A. Hall; S. A. David; G. Olaya: «Resistance to Ungicides in the Qol- STAR Cross Resistance Group: Current Perspective», *Proceedings of the BCPC Conference Pest and Diseases 2000*, 755-762, 2000.

Kuck, K. H.; A. Mehl: «Trifloxystrobin: Resistance Risk and Resistance Management», *Planzenchutz-Nachrichten Bayer* 56 (74):313-325., 2003.

Margot, P.; F. Huggenberger; J. Amrei; B. Weiss: «CGA 279202, a New Broadpectrum Strobilurin Fungicide», *Brighton Crop Protection Conference: Pest & Diseases 1998*: vol. 2: Proceedings of an International Conference, Brighton, Reino Unido, 16-19 November, 1998:375-382, 1998.

Mourichon, X.; M. F. Zapater: «Obtention *in vitro* du stade *Mycosphaerella fijiensis*, forme parfaite de *Cercospora fijiensis*», *Fruits* 45:553-557, 1990.

Pérez, L.; A. Battle: «Monitoring Procedure to Determine Propiconazole Resistance in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet», *Proceedings of the 7th. International Congress of Plant Pathology*, Montreal, 1993.

Pérez, L.; A. Hernández; F. Mauri: «Efficacy of a Biological Warning System for Timing Fungicide Treatments for the Control of Black Sigatoka Disease *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Banana Plantations in Cuba», *Proceedings VII International Congress of Plant Pathology*, Montreal, Jul 28-Ago 5, 1993a.

- Pérez, L.; F. Mauri; B. Barranco; G. García: «Efficacy of EBI's Fungicides in the Control of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet of Bananas and Plantains with Treatments Based on Stage of Evolution of the Disease (Biological Warnings) in Cuba», Proceedings VIIth International Congress of Plant Pathology, Montreal, Jul 28-Ago 5, 1993b.
- Pérez, L.: «Black Sigatoka Disease Ccontrol in Banana and Plantains Plantations in Cuba. Management of the Disease Based on an Integrated Approach», *INFOMUSA*, vol. 7 (1):27-30, 1997.
- Pérez, L.; F. Mauri; A. Hernández; E. Abreu; A. Porras: «Epidemiología de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba», I. Pronóstico bioclimático de los tratamientos en bananos (*Musa acuminata* AAA)», *Revista Mexicana de Fitopatología* 18(1):15-26, 2000a.
- Pérez, L.; A. Hernández; A. Porras: «Epidemiología de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba. II. Pronóstico bioclimático de los tratamientos contra la enfermedad en plátanos (*Musa* spp. AAB)», *Revista Mexicana de Fitopatología* 18 (1):27-36, 2000b.
- Pérez, L.; A. Battle; A. Hernández; R. Trujillo; C. Álvarez; A. Méndez: «Evolución de la sensibilidad a fungicidas de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en banano en Cuba», «Reunión de ACORBAT, 31 de julio al 4 de agosto de 2000, San Juan, Puerto Rico, 2000c.
- Pérez, L.; J. M. Álvarez; M. Pérez: «Economic Impact and Management of Black Leaf Streak Disease in Cuba», *Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook*, Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spots Diseases Held at San José, Costa Rica, 2002a, pp. 71-84.
- Pérez, L.; A. Hernández; L. Hernández; M. Pérez: «Effect of Trifloxystrobin and Azoxystrobin on the Control of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on Banana and Plantains», *Crop Protection* 21:17-23, 2002b.
- 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.; T. B. Sutton: «Characterization of Benomyl Resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, Cause of Black Sigatoka of Banana in Costa Rica», *Plant Disease* 82:931-934, 1998.
- Sierotzki, H.; J. Wullschlegler; U. Gisi: «Point Mutation in Cytochrome B Gene Conferring Resistance to Strobilurine Fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* Field Isolates», *Pest Biochem. Physiology* 68:107-112, 2000a.
- Sierotzki, H.; S. Parisi; U. Steinfeld; I. Tenser; S. Poirey; U. Gisi: «Mode of Resistance to Respiration Inhibitors at the Cytochrome BC₁ Complex of *Mycosphaerella fijiensis*», *Pest Management Science* 56:833-841, 2000b.
- Sisler, H. D.: «Chemistry and Mode of Action of Sterol Biosynthesis Inhibitors. Characteristics of Fungal Resistance to Sterol 14á Demethylase Inhibitors», 4th Meeting of FRAC Banana Working Group, Miami, 25-26 January, 1996.
- Stover, R. H.: «Sigatoka Leaf Spots of Bananas and Plantains», *Plant Disease Reporter* 64:750-756, 1980.
- Vidal, A.: «Sigatoka negra en Cuba. Nuevos focos de plagas y enfermedades», *Boletín Fitosanitario de la FAO* 40:(1-2), 1992.
- Wirz, M.; K. M. Chin: «Detection and Characterization of Strobilurin Resistant Individuals of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in Costa Rica», Proceedings of the XIV ACORBAT Meeting, San Juan, Puerto Rico, 2000.
- Ziegler, H.; J. Benet-Buchholz; W. Etzel; H. Gayer: «Tryfloxystrobin, a New Strobilurin Fungicide with and Outstanding Biological Activity», *Planzenchutz-Nachrichten Bayer* 56 (74):213-230, 2003.