

## NOTA TÉCNICA

RESISTENCIA DE *Mycosphaerella citri* A BENOMIL EN PLANTACIONES DE CÍTRICOS DE COSTA RICA<sup>1</sup>Herman Hidalgo<sup>2</sup>, Turner B. Sutton<sup>2</sup>, Luis Felipe Arauz<sup>3</sup>

## RESUMEN

**Resistencia de *Mycosphaerella citri* a benomil en plantaciones de cítricos de Costa Rica.** Se realizó un estudio en 24 plantaciones de naranjo de Costa Rica para determinar la sensibilidad a benomil de *Mycosphaerella citri* Whiteside, hongo causante de la mancha grasienta de los cítricos. Solamente 13 muestras proporcionaron suficientes ascosporas como para determinar su sensibilidad a benomil. Doce de las muestras representaron un área de aproximadamente 4000 ha de la Región Norte de Costa Rica (cantones de San Carlos y Los Chiles), y una correspondió a un huerto casero de Orosi, en el Valle Central, localidad ubicada a más de 250 km de San Carlos. En dicho huerto nunca se habían hecho aplicaciones de benomil. Todos los aislamientos de la Región Norte produjeron ascosporas resistentes, aunque el benomil no se usa normalmente en esas plantaciones. El 99% de las ascosporas obtenidas de Orosi fueron sensibles, lo que sugiere que población silvestre de *M. citri* es sensible al benomil. Se encontró que el 75% de los huertos muestreados provenían del mismo vivero, en el cual el programa fitosanitario incluye cinco aplicaciones al año de benomil. Diez aislamientos aislados de ese vivero fueron resistentes a benomil. Se sugiere que las poblaciones resistentes fueron introducidas a las plantaciones en material de vivero.

## ABSTRACT

***Mycosphaerella citri* resistance to benomyl in Costa Rican citrus plantations.** Research was carried out on 24 orange plantations in Costa Rica in order to determine the sensitivity to benomyl of *Mycosphaerella citri* Whiteside - fungi causing the citrus greasy spot. Only thirteen samples yielded enough ascospores to determine their sensitivity to benomyl. Twelve of the samples represented an area of approximately 4,000 ha from the Northern part of Costa Rica (the cantons of San Carlos and Los Chiles), and one was from a nonsprayed home orchard in Orosi, in the Central Valley located more than 250 km away from San Carlos. All of the samples from the Northern region yielded benomyl resistant ascospores, although benomyl is not normally used in those areas. Conversely, 99% of the ascospores obtained in Orosi were sensitive; this suggests that the *M. citri* wild population is benomyl-sensitive. It was found that 75% of the orchards sampled came from the same nursery, where the phytosanitary program includes five benomyl applications a year. Furthermore, 10 *M.citri* samples obtained from this nursery were benomyl-resistant. This suggests that the benomyl-resistant isolations found in the plantations were introduced there through the nursery stock.



## INTRODUCCION

En Costa Rica la producción de cítricos, principalmente naranja, ha aumentado significativamente en los últimos años. El área citrícola pasó de aproximadamente 5.000 ha en 1989 a más de 18.000 ha en 1993 (Brenes; Arauz, 1994). La Mancha Grasienta, causada por el hongo *Mycosphaerella citri* Whiteside, es una de las enfermedades foliares más importantes de los cítricos tanto en Costa Rica como a nivel mundial. Esta enfer-

medad a menudo causa defoliaciones severas que pueden tener como resultado pérdidas en rendimiento de hasta 5 t/ha (Whiteside, 1970; Díaz; Brown, 1985).

La Mancha Grasienta ha sido tradicionalmente combatida con tres o cuatro aplicaciones de fungicidas cúpricos por año (3-4 kg. Cu<sup>2+</sup>/ha) en mezcla con aceite mineral, una cada vez que ocurre una brotación vegetativa importante. En los últimos años, la mayoría de los productores ha eliminado el uso de cobre y utili-

<sup>1</sup> Parte de la Tesis de M.Sc. del primer autor presentada a la Universidad de Carolina del Norte, Estados Unidos.

<sup>2</sup> Department of Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Protección de Cultivos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

za aceite agrícola para combatir la enfermedad. La eliminación de ese fungicida ha sido el resultado de la detección de altos niveles de cobre en el follaje de naranjos en la zona de San Carlos, el cual puede producir defoliación prematura de los mismos. Por ejemplo en 1994, la concentración de cobre en hojas llegó hasta 300 ppm en algunas fincas de San Carlos, donde los niveles normales usualmente fluctúan entre 15-25 ppm (Eloy Molina, Laboratorio de Suelos, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. Comunicación personal).

En los últimos años ha surgido interés en usar el fungicida benomil en naranjos debido a su actividad contra *M. citri* y su capacidad de combatir la caída de fruta causada por *Colletotrichum* spp. Algunos de los técnicos en naranja de la región han expresado su interés en desarrollar un programa de control de ambas enfermedades con benomil. Este fungicida fue muy eficaz contra la Mancha Grasienta en Florida, Estados Unidos, cuando fue utilizado por primera vez, pero el rápido desarrollo de resistencia ha limitado su uso. La resistencia de la Mancha Grasienta a benomil fue detectada en Florida después de solo 2-3 años de uso. Whiteside (1980) encontró que el 96% de las ascósporas de *M. citri* provenientes de plantaciones expuestas a cinco aplicaciones de benomil, eran resistentes a este fungicida.

El benomil nunca ha sido usado directamente para controlar la Mancha Grasienta. En plantaciones de naranja en Costa Rica su uso en viveros de naranja para el combate de muerte descendente de brotes causada por los hongos *Colletotrichum* spp. y *Botryosphaeria* spp. es bastante común, y en viveros de la zona de San Carlos llega hasta cinco aplicaciones al año (Victor H. Alfaro, 1994, Vivero Tico Frut. Comunicación personal).

Antes de iniciar un programa de investigación para evaluar la eficacia del benomil para controlar la Mancha Grasienta y la caída temprana de la fruta, es necesario establecer primero una línea base de sensibilidad de *M. citri* a benomil, que permita detectar cualquier cambio que pueda ocurrir una vez que este producto sea utilizado comercialmente en el campo. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el nivel de sensibilidad a benomil en poblaciones de *M. citri* provenientes de plantaciones comerciales de naranja de la Zona Norte de Costa Rica y árboles caseros de otras zonas del país.

## MATERIALES Y METODOS

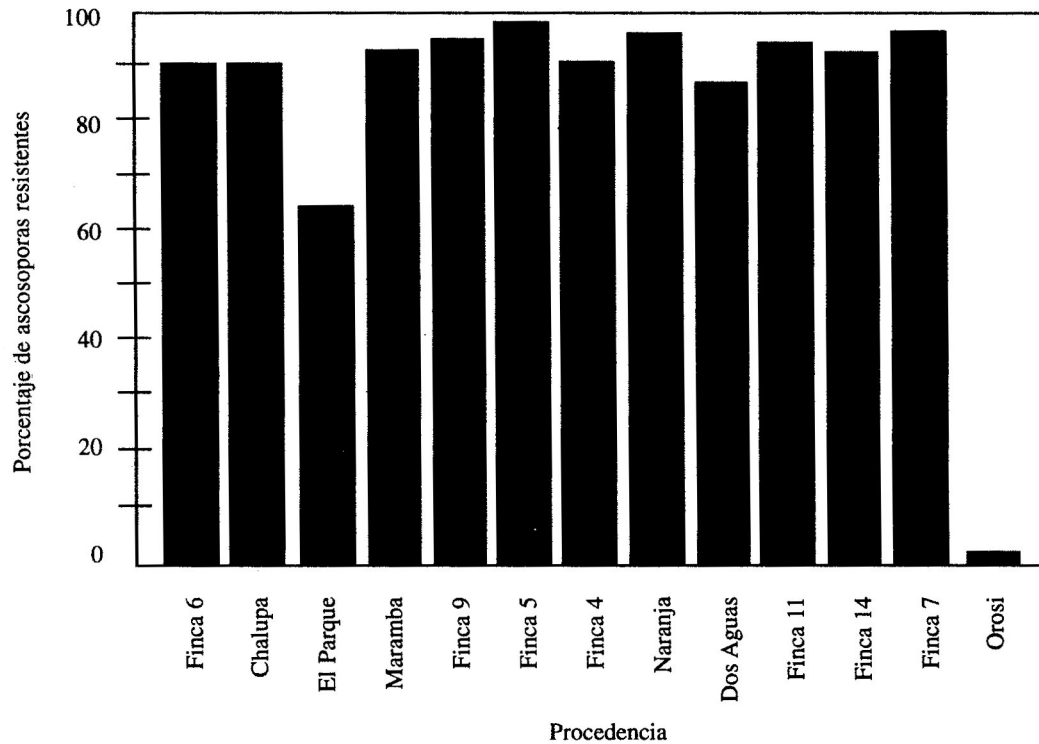
En 24 fincas de naranjos se recolectaron hojas en estado intermedio de descomposición, las cuales contenían pseudotecios de *M. citri* al menos 10 submuestras

fueron tomadas al azar en cada una de las fincas muestreadas. Dieciocho de las fincas muestreadas son plantaciones comerciales ubicadas en la Zona Norte de Costa Rica, en los cantones de San Carlos y Los Chiles, y representan un área de aproximadamente 4.000 ha. En estas fincas no se han hecho aplicaciones de benomil. El clima de estas localidades corresponde a una zona de Bosque Muy Húmedo Tropical, de acuerdo con la clasificación de Zonas de Vida (Holdridge, 1979) Seis muestras adicionales fueron recolectadas en plantaciones caseras de cítricos en el Valle Central, en las localidades de Orosi, Turrialba, San Antonio de Belén, Cartago y Heredia, Los Chiles y aisladas (por lo menos a 250 km de la Zona Norte). El clima de estas localidades corresponde a una zona de Bosque Húmedo Premontano, con excepción de Turrialba, que corresponde a un Bosque Muy Húmedo Tropical.

Hojas de cada muestra se agitaron en agua tibia (aproximadamente 25°C) por 20 min con el fin de rehidratarlas y remover partículas de suelo y otros contaminantes. Seis a ocho hojas con abundantes pseudotecios fueron seleccionadas de cada muestra y colocadas en una torre para descarga de esporas conforme a lo descrito por Gilpatrick; *et al.* (1972), por 30 min. Las esporas fueron depositadas en cuatro puntos sobre platos de petri que contenían agar-agua y agar-agua suplementado con 5 mg/ml de benomil. Posteriormente, los platos de petri fueron incubados a aproximadamente 22°C durante 24 horas. De 50 a 60 ascósporas por punto de deposición fueron examinadas para determinar el número de esporas que mostraban germinación normal. El experimento fue repetido dos veces y su resultado se promedió.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solamente 13 de las 24 muestras tomadas liberaron suficientes esporas como para determinar de manera confiable su sensibilidad a benomil. Doce de estas muestras correspondieron a plantaciones comerciales de naranja ubicadas en San Carlos, Los Chiles y una plantación se ubicó en una zona con clima diferente y de manejo no comercial (en Orosi) que nunca recibió aplicaciones de fungicidas. En general, más de un 90% de las esporas de todas las muestras germinaron normalmente en agar-agua. En platos conteniendo AA+benomil se encontraron altos niveles de resistencia en todas las plantaciones de la Zona Norte (Figura 1), ocho de las plantaciones produjeron más de 90% de esporas resistentes a benomil, tres produjeron entre 85-90% de esporas resistentes y una sobre 60%. Estos altos niveles de resistencia son inesperados ya que el benomil nunca ha sido usado comercialmente en los huertos cítricos de dicha zona para el combate de enfermedades. Por el



**Figura 1.** Porcentaje de ascosporas de *Mycosphaerella citri* que germinaron normalmente en agar-agua. Suplementado con cinco  $\mu\text{g/ml}$  de benomil. Todas las fincas, con excepción de Orosi, son plantaciones comerciales de naranja. La muestra de Orosi proviene de una pequeña plantación privada.

de Orosi demostraron ser sensibles a benomil (Figura 1), lo cual demuestra la existencia de una población natural de *M. citri* sensible a benomil.

En la zona de la Zonas Norte, el benomil ha sido usado regularmente en viveros de naranja para combatir la muerte descendente de brotes causada por *Colletotrichum* spp. y *Botryosphaeria* spp., ambas importantes enfermedades de cítricos en Costa Rica. El 75% de las plantaciones muestreadas obtuvieron sus árboles del mismo vivero, en el cual se han observado síntomas de Mancha Grasienta, y cuyo programa anual de aplicaciones de fungicida incluye por lo menos cinco aplicaciones de benomil. Posteriormente, se obtuvieron diez aislamientos de material infectado proveniente de este vivero (de San Carlos) los cuales mostraron crecimiento similar en agar papa dextrosa (PDA) y PDA con 5 mg/ml de benomil. Los resultados sugieren que poblaciones de *M. citri* resistentes a benomil fueron introducidas a las plantaciones en material de vivero.

La resistencia a benomil ha demostrado ser estable en otros patosistemas como es el caso de *Botrytis* en uva, *Cercospora* y *Cercosporidium* en maní (Smith, 1988) y *Mycosphaerella fijiensis* en banano (Romero,

1995), donde ha sido posible detectar aislamientos resistentes en el campo aún varios años después de que esta molécula ha sido eliminada de los programas de combate. Una situación similar podría estar ocurriendo en la Zona Norte de Costa Rica, donde las poblaciones resistentes se han mantenido presentes a pesar de que el benomil no ha sido utilizado.

Estos resultados indican que el benomil no es una opción para el combate de la Mancha Grasienta en la Zona Norte de Costa Rica. Además, demuestran la necesidad de implementar programas de manejo de resistencia en el ámbito de vivero. Fungicidas que presenten riesgo de desarrollo de resistencia no deben usarse en viveros cuando el riesgo de transportar el patógeno en material infectado es alto.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer a Ricardo Astúa Marín, asistente del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, por su ayuda técnica en el campo y en el laboratorio, lo cual hizo posible la realización de este estudio.

**LITERATURA CITADA**

- BRENES, L.E.; ARAUZ, L.E 1994. Crop protection in citrus production. Pesticide use in Costa Ricas Northern region orchards. Preliminary reporto Interlinkage Program NCSU-UNA-UCR San José, Costa Rica. sp.
- DÍAZ, J.A.; BROWN, O. 1985. Influence of greasy spot (*Mycosphaerella citri*) Whiteside on Valencia orange yields. Centro Agrícola 12:127-137.
- GILPATRICK, J.D.; SMITH, C.A.; BOWERS, D.R 1972. A method for collecting ascospores of *Venturia inaequalis* for spore germination studies. Plant Dis. Rep. 56: 39-42.
- HOLDRIDGE, L.R 1979. Ecología basada en zonas de vida. San José, Costa Rica, IICA. 216 p.
- SMITH, C.M. 1988. History of benzimidazole use and resistance. *In*: Fungicide resistance in North America. Charles J. De1p editor. APS Press. Sto Paul, Mn. pp. 23-24.
- ROMERO, RA.1995. Dynamics offungicide resistant populations of *Mycosphaerella fijiensis* and epidemiology of black sigatoka of bananas. Tesis Ph.D. North Carolina State University, Raleigh, NC. EE.UU. 113 p.
- WHITESIDE, J.O. 1970. Etiology and epidemiology of citrus greasy spot. Phytopathology 60:1409-1414.
- WHITESIDE, J.O. 1980. Tolerance of *M. citri* to benomy1 in Florida citrus groves. Plant Disease 64:300-302.
- WHITESIDE, J.O. 1989. Comparison of various oils for controlling greasy spot on grapefruit leaves and fruit. Proc. Fla. State Hort. Soco 102: 13-16.