

## Efecto del Azoxystrobin Sobre *Moniliophthora roreri*, Agente Causal de la Moniliasis del Cacao (*Theobroma cacao*)

### Effect of the Azoxystrobin on *Moniliophthora roreri*, Causal Agent of Frosty Pod Rot of Cocoa (*Theobroma cacao*)

**Magdiel Torres de la Cruz**, División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Cárdenas km. 0.5. CP 86039, México; **Carlos Fredy Ortiz García**, Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. km. 3.5 Carretera Cárdenas-Huimanguillo, H. Cárdenas, Tabasco, CP 86500, México; **Daniel Téliz Ortiz, Antonio Mora Aguilera y Cristian Nava Díaz**, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. Correspondencia: cfortizg@gmail.com

(Recibido: Diciembre 10, 2010 Aceptado: Abril 24, 2011)

Torres de la Cruz M, Ortiz García CF, Téliz Ortiz D, Mora Aguilera A y Nava Díaz C. 2013. Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). Revista Mexicana de Fitopatología 31:65-69.

**Resumen.** El hongo *Moniliophthora roreri*, causante de la moniliasis, es la principal limitante parasítica de la producción de cacao en Tabasco, México. El fungicida azoxystrobin se evaluó como agente curativo de *M. roreri*, en Tabasco. *In vitro*, azoxystrobin inhibió el 100 % de la germinación de conidios a una concentración de 450 mg L<sup>-1</sup> y el 96 % del crecimiento micelial con una concentración de 1250 mg L<sup>-1</sup>. La concentración efectiva 95 (CE<sub>95</sub>) para la germinación y el crecimiento micelial fue de 138 y 120 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Frutos tratados en campo con azoxystrobin a 1250 mg L<sup>-1</sup> resultaron con una mortalidad del 42 % comparado con 94 % en frutos sin tratamiento. La efectividad terapéutica del azoxystrobin fue de 55 % en frutos juveniles de hasta 10 cm de longitud, infectados naturalmente y con síntomas de *jiba* o hinchamientos. Los frutos tratados, alcanzaron madurez, con desarreglo y disminución en el número de granos. Este es el primer reporte de la acción curativa de un fungicida sobre *Moniliophthora roreri* y muestra que el azoxystrobin puede ser incorporado en programas de manejo integrado de la enfermedad y del cultivo.

Palabras claves adicionales: Frosty pod rot, estrobirulinas, control químico, efecto terapéutico.

*Moniliophthora roreri* es el agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*) (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Se originó en el noreste de Colombia y es una de las enfermedades más destructivas en los principales países americanos productores de cacao. Esta enfermedad fue detectada por primera vez en Colombia en 1817; cien años más tarde se reportó en Ecuador en 1917, y en 2005 en

**Abstract.** The fungus *Moniliophthora roreri*, causal agent of frosty pod rot, is the main limiting disease of cocoa (*Theobroma cacao*) production in Tabasco, México. The fungicide azoxystrobin was assessed as a healing agent of *M. roreri*. *In vitro*, azoxystrobin at 450 mg L<sup>-1</sup> inhibited 100 % of the conidial germination and 96 % of mycelium growth at 1250 mg L<sup>-1</sup>. The effective concentration 95 (EC<sub>95</sub>) for germination and micelial growth was 138 y 1203 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Azoxystrobin at 1250 mg L<sup>-1</sup>, *in vivo*, reduced fruit rot to 42 % compared with 94 % in untreated fruits. The therapeutic effectiveness of azoxystrobin was 55 % in young fruits, up to 10 cm long, naturally infected and with symptoms of swellings. The treated fruits reached an irregular maturity with fewer seeds. This is the first report of the curative action of a fungicide on *Moniliophthora roreri*, and indicates the possible incorporation of azoxystrobin in integrated disease and crop management programs.

Additional key words: Moniliasis, strobirulins, chemical control, curative effect.

*Moniliophthora roreri* is the causative agent of cocoa frosty pod rot disease (*Theobroma cacao*) (Phillips-Mora and Wilkinson, 2007). This disease originated in northeastern Colombia and is one of the most destructive diseases in major cocoa producing american countries. It was first detected in Colombia in 1817; hundred years later it was reported in Ecuador in 1917, and in 2005 in Mexico (Phillips-Mora *et al.*, 2006; Phillips-Mora and Wilkinson, 2007). Currently, *M. roreri* is the main parasitic limitation of cocoa crop in Mexico with losses exceeding 75% of annual production (Torres-de la Cruz *et al.*, 2011). Cultural practices have been the most common method for controlling frosty pod rot of cocoa, and the use of fungicides has been a practice rarely used due to poor results (Evans, 1981) and the fluctuating price of cocoa that make unaffordable the applications; however, the selection of appropriate fungicides against *M. roreri* could give

México (Phillips-Mora *et al.*, 2006; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Actualmente *M. royeri* es la principal limitante parasítica del cultivo del cacao en México, con pérdidas que superan el 75% de la producción anual (Torres-de la Cruz *et al.*, 2011). Las prácticas culturales han sido el método más aplicado para el combate de la moniliasis del cacao, y el uso de fungicidas ha sido una práctica poco empleada, debido a erráticos resultados (Evans, 1981) y al precio fluctuante del cacao que hacen incosteable la aplicación; sin embargo, la selección de fungicidas adecuados contra *M. royeri* podría dar resultados favorables en plantaciones de alto rendimiento (Murillo y González, 1984). Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el azoxystrobin como agente curativo de *M. royeri*, en Tabasco, México, bajo la hipótesis de que el azoxystrobin posee efecto erradicativo de *M. royeri* en infecciones tempranas (fase biotrófica) de frutos juveniles (*chilillo*), recuperándolos de la infección y permitiendo la formación de frutos comerciales.

La cepa de *M. royeri* se aisló de frutos de cacao en estado inicial de necrosis externa (Evans, 1981) procedentes del estado de Tabasco. El azoxystrobin (Amistar® 50 % WG, Syngenta Crop Protection AG, Suiza) se evaluó *in vitro* sobre la germinación de conidios y el crecimiento micelial de *M. royeri* a concentraciones de 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 y 1250 mg L<sup>-1</sup> (tratamientos) en medio PDA (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) (Zavala-León *et al.*, 2005), con cinco repeticiones por tratamiento. La germinación (%) se determinó con base en la lectura de 100 conidios por repetición y tratamiento, y las lecturas se realizaron cada 24 h hasta las 144 h, tiempo en que el testigo (sin fungicida) superó el 90 % de germinación. El crecimiento micelial, medido (cm) en dos ejes (horizontal y vertical), se evaluó cada 24 h con ayuda de un vernier digital (Trupper®, México). Las mediciones terminaron a los dieciséis días, tiempo en que el testigo (sin fungicida) llenó la caja. *In vivo*, el azoxystrobin se evaluó sobre frutos de cacao de uno a dos meses de edad, infectados naturalmente por *M. royeri* con hinchamientos superficiales (*jibas* pequeñas). Los frutos fueron marcados y la mortalidad se cuantificó semanalmente. Los tratamientos (azoxystrobin a 0 y 1250 mg L<sup>-1</sup> en dilución acuosa) se evaluaron bajo un diseño completamente al azar repetido dos veces en el tiempo (dos ciclos reproductivos). Cada unidad experimental consistió en 100 frutos juveniles (*chilillos*) (de 8 hasta 10 cm de longitud), y el azoxystrobin se aplicó por aspersión con bomba de mochila dirigida únicamente al fruto juvenil una sola vez al inicio de cada ensayo. A 30 y 60 d después de la aplicación, todos los frutos fueron protegidos con hidróxido de cobre (1500 g.i.a. ha<sup>-1</sup>) (Bateman *et al.*, 2005), para evitar infecciones posteriores. Los frutos que llegaron a madurez de consumo se abrieron longitudinalmente para documentar el arreglo de las semillas y los daños alcanzados por la enfermedad.

Los porcentajes de inhibición de la germinación y del crecimiento micelial *in vitro*, así como la efectividad del azoxystrobin en campo, se obtuvieron mediante la fórmula de Abbott (1925). Los datos fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada del valor porcentual y

favorable results in high yield plantations (Murillo and Gonzalez, 1984). Therefore, in the present study, azoxystrobin has been evaluated as a healing agent against *M. royeri* in Tabasco, Mexico, under the hypothesis that azoxystrobin has eradicated effect against *M. royeri* in early infections (biotrophic phase) of young fruits (*chilillo*), recovering them from infection and allowing the formation of commercial fruits.

The *M. royeri* strain was isolated from cocoa fruits of initial stages of external necrosis (Evans, 1981) from Tabasco State. Azoxystrobin (Amistar® 50 % WG, Syngenta Crop Protection AG, Switzerland) was evaluated *in vitro* on conidial germination and mycelial growth of *M. royeri* at concentrations of 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 and 1250 mg L<sup>-1</sup> (treatments) on PDA medium (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) (Zavala-León *et al.*, 2005), with five replicates per treatment. Germination (%) was estimated based on the reading of 100 conidia per replicate and treatment, and readings were taken every 24 h until completing 144 h, when the control (no fungicide) exceeded 90% germination. Mycelial growth measured (in cm) on two axes (horizontal and vertical), was assessed every 24h using a digital vernier (Trupper®, Mexico). The measurements ended after sixteen days when the control (no fungicide) filled the box. Azoxystrobin was evaluated on one to two months old cocoa fruits *in vivo* that were naturally infected by *M. royeri* with superficial swellings (small humps). The fruits were marked and the mortality was measured weekly. The treatments (azoxystrobin at 0 and 1250 mg L<sup>-1</sup> in aqueous dilution) were evaluated under a completely randomized design repeated twice in time (two reproductive cycles). Each experimental unit consisted of 100 young fruits (*chilillos*) (8 to 10 cm in length) and azoxystrobin was applied by knapsack spray directed only to young fruit once at the beginning of each trial and 30 and 60 days after application, all the fruits were protected with copper hydroxide (1500 g.i.a. ha<sup>-1</sup>) to prevent further infections (Bateman *et al.*, 2005). The fruits that reached ripening were cut longitudinally to document the seeds arrangement and sickness damage.

The inhibition percentages of germination and mycelial growth *in vitro*, as well as the effectiveness of azoxystrobin in the field, were obtained by using Abbott's formula (1925). The data were transformed to the arcsine of the square root of the percentage value and subjected to variance analysis and mean separation test (Tukey, P = 0.05) using SAS (1998). From inhibition percentages obtained *in vitro*, the effective concentration 95 (EC<sub>95</sub>) was estimated using Solver (Excel® Microsoft®).

Azoxystrobin at 450 mg L<sup>-1</sup> inhibited 100 % of the germination of conidia (Table 1) and its EC<sub>95</sub> was 138 ppm. In the absence of fungicide, the average germination was 97 % after 144 h. Mycelial development of *M. royeri* was inhibited by 90 % at all concentrations tested (Table 1); the highest inhibition (96 %) was obtained with 1250 mg L<sup>-1</sup> dose with an EC<sub>95</sub> of 1203 mg L<sup>-1</sup>. This product has shown *in vitro* effectiveness on germination and mycelial growth of *Alternaria alternata* in apples (Reuveni and Sheglov, 2002), and on *Colletotrichum gleosporioides* in papaya and

sometidos a un análisis de varianza y prueba de separación de medias (Tukey;  $P < 0.05$ ) mediante SAS (1998). De los porcentajes de inhibición obtenidos *in vitro*, se estimó la concentración efectiva 95 ( $CE_{95}$ ) mediante Solver (Excel® Microsoft®).

El azoxystrobin a  $450 \text{ mg L}^{-1}$  inhibió el 100 % de la germinación de conidios (Cuadro 1) y su  $CE_{95}$  fue de 138 ppm. En ausencia del fungicida, la germinación promedio fue 97 % después de las 144 h. El desarrollo micelial de *M. roreri* fue inhibido en 90 % a todas las concentraciones evaluadas (Cuadro 1); la mayor inhibición (96 %) se obtuvo con la dosis de  $1250 \text{ mg L}^{-1}$  con una  $CE_{95}$  de  $1203 \text{ mg L}^{-1}$ . Este producto ha mostrado efectividad *in vitro* sobre la germinación y desarrollo micelial de *Alternaria alternata* en manzana (Reuveni y Sheglov, 2002), y *Colletotrichum gleosporioides* en papaya y mango (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2004; Zavala-León *et al.*, 2005). Así también ha mostrado efectividad en el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano y plátano (Pérez, *et al.*, 2002).

mango (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2004; Zavala-Leon *et al.* 2005). It has also shown effectiveness in controlling black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) in banana and plantain (Perez, *et al.*, 2002).

*In vivo*, azoxystrobin at  $1250 \text{ mg L}^{-1}$  showed the lowest fruit mortality (42 %) with therapeutic efficiency of 55 %, while 94 % of the control fruits (without fungicide) died. The results allow to corroborate the azoxystrobin therapeutic effects because it was applied on diseased fruits ( 2 months old, in early phase of infection) and 51% of them recovered from the infection (Figure 1). The treated diseased fruits that reached ripening showed decrease in the number of seeds and fails in their development, similar to those observed by Evans (1981) in fruits infected by *M. roreri* in *chilillo* stage. Azoxystrobin showed translaminar activity which confers the ability to be absorbed and distributed into the tissue locally. It inhibits mitochondrial respiration by blocking the transfer of electrons to cytochrome bc<sub>1</sub> complex (Bartlett *et al.*, 2002), and therefore, the ATP formation. This may explain the

Cuadro 1. Efecto del azoxystrobin sobre la germinación de conidios y el desarrollo micelial *in vitro* de *Moniliophthora roreri* aislado de cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México.

Table 1. Effect of azoxystrobin on conidial germination and mycelial growth *in vitro* of *Moniliophthora roreri* isolated from cocoa (*Theobroma cacao*) in Tabasco, Mexico.

Tratamientos	Germinación Eficacia Abbott <sup>y</sup> (% inhibición)		Desarrollo Micelial Eficacia Abbott <sup>y</sup> (% inhibición)	
Testigo	---	---	---	---
Azoxystrobin $150 \text{ mg L}^{-1}$	95.4 ± 0.6	c	90.2 ± 0.5	d
Azoxystrobin $300 \text{ mg L}^{-1}$	98.9	b	90.5 ± 0.3	d
Azoxystrobin $450 \text{ mg L}^{-1}$	100	a	90.4 ± 0.4	d
Azoxystrobin $600 \text{ mg L}^{-1}$	100	a	90.5 ± 0.4	d
Azoxystrobin $750 \text{ mg L}^{-1}$	100	a	91.3 ± 0.2	c
Azoxystrobin $900 \text{ mg L}^{-1}$	100	a	92 ± 0.3	c
Azoxystrobin $1050 \text{ mg L}^{-1}$	100	a	93.3 ± 0.2	b
Azoxystrobin $1250 \text{ mg L}^{-1}$	100	a	95.6 ± 0.4	a

<sup>y</sup>Medida con letras iguales dentro de la misma columna, no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ )

<sup>z</sup>Valores no calculados debido a la naturaleza de la fórmula de Abbott.

*In vivo*, el azoxystrobin a  $1250 \text{ mg L}^{-1}$  mostró la menor mortalidad de frutos (42 %) con una eficiencia terapéutica del 55 %, mientras que el 94 % de los frutos testigo (sin fungicida) murieron. Los resultados permiten deducir el efecto terapéutico del azoxystrobin ya que se aplicó en frutos enfermos ( 2 meses de edad, en etapa temprana de infección) y el 51 % se recuperaron de la infección (Figura 1). Los frutos enfermos tratados que alcanzaron la madurez de consumo presentaron disminución en el número de semillas y fallas en el desarrollo de las mismas, semejante a lo observado por Evans (1981) en frutos infectados por *M. roreri* en etapa de *chilillo*. El azoxystrobin presenta actividad translaminar que le confiere la capacidad de ser absorbido y distribuido

effective action of this fungicide on *M. roreri* growth suppression inside the fruit in early development stages (*chilillos*). The suppressive effect of mycelial growth within the host tissue is an important objective in the management of diseases (Reuveni and Sheglov, 2002). This is the first report of the healing action of a fungicide against *M. roreri*, and azoxystrobin joins other effective fungicides against *M. roreri* such as flutolanil and copper hydroxide (Hidalgo *et al.* 2003; Bateman *et al.*, 2005).

#### LITERATURA CITADA

Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology

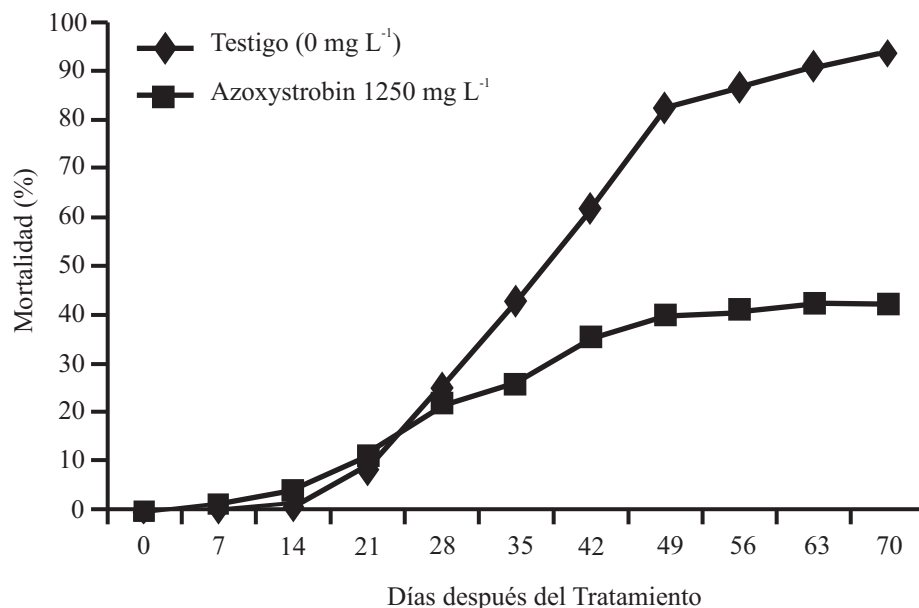


Figura 1. Efecto del azoxystrobin sobre el porcentaje (%) de frutos de cacao (*Theobroma cacao*) infectados por *Moniliophthora roreri* en Tabasco, México.

Figure 1. Effect of azoxystrobin on the percentage (%) of cacao fruit (*Theobroma cacao*) infected by *Moniliophthora roreri* in Tabasco, Mexico.

localmente dentro del tejido. Inhibe la respiración mitocondrial al bloquear la transferencia de electrones al complejo citocromo bc, (Bartlett *et al.*, 2002), y por lo tanto la formación de ATP. Esto puede explicar la efectiva acción de este fungicida sobre la supresión del crecimiento de *M. roreri* dentro del fruto en etapa temprana de desarrollo (*chilillos*). El efecto supresivo del crecimiento micelial dentro del tejido del hospedero es un objetivo importante en el manejo de enfermedades (Reuveni y Sheglov, 2002). Este es el primer reporte de la acción curativa de un fungicida sobre *M. roreri*, y el azoxystrobin se suma a otros fungicidas efectivos contra *M. roreri* como son el flutolanil e hidróxido de cobre (Hidalgo *et al.*, 2003; Bateman *et al.*, 2005).

18:256-267.

Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M and Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58:649-662.

Bateman RP, Hidalgo E, García J, Arroyo C, ten Hoopen GM, Adonijah V and Krauss U. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology* 147:129-138.

Evans HC. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. *Phytopathological Papers* 24:1-44.

Gutiérrez AJG, Gutiérrez AO, Nieto AD, Téliz OD, Zavaleta ME y Delgadillo SF. 2004. Manejo integrado de la antracnosis [*Coletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] del mango (*Mangifera indica* L) durante

la postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:395-402.

Hidalgo E, Bateman RP, Krauss U, ten Hoopen M and Martínez A. 2003. A field investigation into delivery systems for agents to control *Moniliophthora roreri*. *European Journal of Plant Pathology* 109:953-961.

Murillo D y González LC. 1984. Evaluación en laboratorio y campo de fungicidas para el combate de la moniliasis del cacao. *Agronomía Costarricense* 8:83-89.

Pérez L, Hernández A, Hernández L and Pérez M. 2002. Effect of trioxystrobin and azoxystrobin on the control of black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on banana and plantain. *Crop Protection* 21:17-23.

Phillips MW, Coutiño A, Ortiz CF, López AP, Hernández J and Aime MC. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology* 55:584.

Phillips MW and Wilkinson MJ. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 97:1644-1647.

Reuveni M and Sheglov D. 2002. Effects of azoxystrobin, difeconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. *Crop Protection* 21:951-955.

SAS Institute Inc. 1998. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.03 Ed. SAS Institute INC. Cary, NC. USA. 1028 p.

Torres de la CM, Ortiz GCF, Téliz OD, Mora AA and Nava DC. 2011. Temporal progress and integrated

management of frosty pod rot [*Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans *et al.*] of cocoa (*Theobroma cacao*) in Tabasco, Mexico. *Journal of Plant Pathology* 93:31-36.  
Zavala LMJ, Tun SJM, Cristóbal AJ, Ruíz SE, Gutiérrez AO, Vázquez CM y Méndez GR. 2005. Control

postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11:251-255.