



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO EN FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**EPIDEMIOLOGÍA Y MANEJO DE LA SIGATOKA NEGRA  
(*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) DEL BANANO (*Musa  
AAA*)**

**LUCIANO MARTÍNEZ BOLAÑOS**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2012**

La presente tesis, titulada: **Epidemiología y manejo de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) del banano (*Musa AAA*)** realizada por el alumno: **Luciano Martínez Bolaños**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**POSTGRADO EN FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

CONSEJERO



---

Dr. Daniel Téliz Ortiz

ASESOR



---

Dr. J. Antonio Mora Aguilera

ASESOR



---

Dr. Daniel Nieto Ángel


ASESOR



---

Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel

ASESOR



---

Dr. José Isabel Cortés Flores

Montecillo, Texcoco, México, 20 de Noviembre de 2012

## RESUMEN GENERAL

EPIDEMIOLOGÍA Y MANEJO DE LA SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*

Morelet) DEL BANANO (*Musa AAA*)

Luciano Martínez Bolaños, D. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) afecta severamente el área fotosintética de la planta, crecimiento y rendimiento del cultivo del banano. Se estudió el grado de sensibilidad de cepas de *M. fijiensis* aisladas de plantaciones de banano en Tabasco y Chiapas, México, al propiconazol y tridemorf. Los bioensayos se realizaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA<sup>®</sup>) adicionados con varias concentraciones del fungicida. Los medios se inocularon con 100 µL de una suspensión conidial y fragmentos miceliares del hongo, y se incubaron en oscuridad a 26 °C por 7 d. La concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) y 95% (CE<sub>95</sub>) para cada aislamiento se estimó mediante análisis Probit del porcentaje de inhibición del crecimiento relativo del patógeno. Los valores CE<sub>50</sub> en propiconazol variaron de 0.0001 a 0.95 mg L<sup>-1</sup>; y los de CE<sub>95</sub> de 0.006 a 12.51 mg L<sup>-1</sup>. La proporción de resistencia en el nivel CE<sub>95</sub> fue superior a 2,085×, para el aislamiento MF-RmC<sub>2</sub> de la finca Remedios en Teapa, Tabasco. Los valores para CE<sub>50</sub> en tridemorf variaron de 0.00001 a 0.002 mg L<sup>-1</sup> y los de CE<sub>95</sub> de 0.03 a 0.85 mg L<sup>-1</sup>. La proporción de resistencia a nivel CE<sub>95</sub> entre el aislamiento sensible de referencia y el menos susceptible (MF-RcC<sub>5</sub> de la finca el Recreo, Tabasco) fue superior a 28.3×. La correlación positiva entre el número de aplicaciones y los valores de CE<sub>50</sub> y de CE<sub>95</sub> son indicativos de que la presión de selección ejercida en esta plantación generó resistencia al propiconazol.

Palabras clave: Sigatoka, *Musa*, Banano, propiconazol y tridemorf.

## ABSTRACT

### EPIDEMIOLOGY AND MANAGEMENT OF BLACK SIGATOKA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) IN BANANA (*Musa* AAA)

Luciano Martínez Bolaños, D. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) affects the photosynthetic area of plants, growth and yield of banana crop. Sensibility of strains of *Mycosphaerella fijiensis* isolated in banana plantations of Tabasco and Chiapas, Mexico, to propiconazol and tridemorph were also studied. The bioassays were carried out in potato dextrose agar (PDA) culture medium added with different concentrations of the fungicide. The media were inoculated with 100  $\mu$ 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 (EC<sub>50</sub>) and 95 % (EC<sub>95</sub>) was estimated through Probit analysis of the percentage of inhibition of the relative growth of the pathogen. The EC<sub>50</sub> values in propiconazol varied from 0.0001 to 0.95 mg L<sup>-1</sup> and those of EC<sub>95</sub> from 0.006 to 12.51 mg L<sup>-1</sup>. The proportion of resistance in the level of C<sub>95</sub> was higher than 2085<sub>x</sub>, for the isolate MF-RmC<sub>2</sub> of the Remedios plantation in Teapa, Tabasco. The values for EC<sub>50</sub> in tridemorph varied from 0.00001 to 0.002 mg L<sup>-1</sup> and those of EC<sub>95</sub> from 0.03 to 0.85 mg L<sup>-1</sup>. The proportion of resistance to level EC<sub>95</sub> between the sensitive isolate of reference and the least susceptible (MF-RcC<sub>5</sub> of the Recreo plantation, Tabasco) was higher than 28.3<sub>x</sub>. The positive correlation between the number of applications and the values of EC<sub>50</sub> and of EC<sub>95</sub> are indicative that the selection pressure exerted in this plantation generated resistance to the propiconazol.

Key words: Black sigatoka, *Musa*, Banano, propiconazol y tridemorf.

**Dedico esta tesis con cariño y mucho amor:**

A mi Padres: *Marciano y Leonor*

A mi esposa: *Sandra Bolaños Suvizar*

*A mis hijas:*

*Syl Soledad, Danna Montserrat y Sandra Ceres*

*A mi hijo:*

*Luciano Martínez Bolaños.*

*A mis hermanos:*

*Jorge, Jesús, Rogelio y Misael y sus familias.*

Y para todos mis amigos.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su inmensurable e infinito Amor

Al Pueblo de México por el todo el apoyo económico para realizar mis estudios a través del CONACyT.

Al Colegio de Postgraduados por permitir iniciar mis estudios en esta Honorable Institución dentro del Instituto de Fitosanidad-Fitopatología.

A la Universidad Autónoma Chapingo por ser mi *Alma Mater* y por brindarme todas las oportunidades para desarrollarme como profesionalista y realizar mis estudios de Postgrado.

A mis profesores integrantes de mi consejo particular y amigos: Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dr. José Antonio Mora Aguilera, Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel, Dr. Daniel Nieto, Dr. José Isabel Cortés Flores.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), y Fundación Produce Oaxaca A.C. por el financiamiento y apoyo para la realización del trabajo de investigación.

A todos los productores de plátano y banano de México por permitir ser parte de su familia. Muchas gracias.

A todos mis amigos que me apoyaron para hacer posible este logro. Infinitamente, muchas gracias.

# CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>CAPITULO I: GENERALIDADES DE LA SIGATOKA NEGRA.....</b>	<b>2</b>
1.1 Introducción general .....	2
1.2 Revisión de literatura .....	4
1.2.1 Importancia del cultivo .....	4
1.2.2 Descripción botánica .....	5
1.2.3 Problemas fitosanitarios de bananos y plátanos .....	7
1.2.4 Sigatoka Negra ( <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ) .....	7
1.2.4.1 Taxonomía.....	8
1.2.4.2 Agente causal.....	8
1.2.4.3 Patogénesis.....	10
1.2.4.4 Epidemiología.....	11
1.2.4.5 Impacto sobre la fisiología de la planta.....	11
1.2.4.6 Interacción <i>Mycosphaerella fijiensis</i> – <i>Musa</i> spp.....	12
1.2.4.7 Manejo de la Sigatoka Negra.....	12
1.2.5 Manejo de la enfermedad.....	14
1.2.5.1 Control cultural .....	14
1.2.5.2 Control biológico.....	14
1.2.5.3 Control genético .....	15
1.2.5.4 Control químico .....	16
1.2.5.5 Impacto económico y ambiental.....	17
1.2.6 Reducción del inoculo.....	18
1.2.6.1 Deshoje .....	18
1.2.6.2 Minicomposteo .....	18
1.2.6.3 Aplicación de urea.....	19
1.3 Literatura citada.....	21
<b>CAPÍTULO II. RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN POBLACIONES DE</b>	
<b><i>Mycosphaerella fijiensis</i> DEL SURESTE MEXICANO .....</b>	<b>30</b>
2.1 Introducción.....	34
2.2 Materiales y métodos.....	35
2.2.1 Aislamiento e identificación de los aislamientos .....	35
2.2.2 Caracterización cultural y molecular de aislamientos .....	36
2.2.3 Concentración de fungicidas y efecto en el crecimiento micelial .....	38
2.2.4 Análisis estadístico .....	39
2.3 Resultados y discusión .....	40
2.3.1 Aislamiento e identificación de aislamientos .....	40

2.3.2 Caracterización molecular de aislamientos .....	40
2.3.3 Efecto del propiconazol y tridemorf en el crecimiento de <i>M. fijiensis</i> .....	41
2.3.3.1 Respuesta al propiconazol .....	41
2.3.3.2 Respuesta al tridemorf .....	44
2.3.4 Correlación entre variables.....	45
2.4 Conclusiones .....	48
2.5 Literatura citada.....	49



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los principales clones e híbridos cultivados en México. ....	6
Cuadro 2. Aislamiento de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en plantaciones de banano ( <i>Musa acuminata</i> Colla AAA 'Cultivar Gran Naime') con diferente manejo químico en regiones productoras de Tabasco y Chiapas, México. Ciclo 2010-11. ....	37
Cuadro 3. Sensibilidad al fungicida propiconazol de aislamientos de <i>M. fijiensis</i> colectadas en fincas bananeras de Tabasco y Chiapas con diferentes programas de control. Ciclo 2010-2011. ....	43
Cuadro 4. Sensibilidad al fungicida tridemorf de aislamientos de <i>M. fijiensis</i> colectadas en fincas bananeras de Tabasco y Chiapas con diferentes programas de control. Ciclo 2010-2011. ....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Verificación taxonómica de ocho aislamientos de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> 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®). ....	41
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% ( $CE_{95}$ ) para 23 aislamientos seleccionados de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> . A) propiconazol, B) tridemorf. $r$ es el valor de la correlación Pearson $\text{Prob} >  r $ suponiendo $H_0: \text{Rho}=0$ . ....	46

**CAPITULO I:**  
**GENERALIDADES DE LA SIGATOKA NEGRA**

# CAPITULO I

## 1.1 Introducción general

El banano (*Musa acuminata* Colla AAA) y plátano (*Musa balbisiana* Colla AAB) se consideran nativos del Sureste Asiático, incluyendo el Norte de la India, Burma, Camboya y parte de la China sur, así como las Islas mayores de Sumatra, Java, Borneo, las Filipinas y Taiwán. El nombre de plátano, banano o guineo agrupa a un gran número de plantas herbáceas del género *Musa*, tanto híbridos obtenidos horticulturalmente a partir de las especies silvestres del género *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* como cultivares genéticamente puros de estas especies. Clasificado originalmente por Linneo como *Musa paradisiaca* en 1753 (Simmonds y Shepherd, 1955). El cultivo de banano (*Musa acuminata* Colla AAA) y plátano (*Musa balbisiana* Colla AAB) se encuentra distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Wong *et al.*, 2002); su importancia radica por su volumen de consumo en casi todos los países, ya sea como fruta fresca o bajo cocción (FAO, 2012).

La productividad del cultivo de banano puede ser afectada por enfermedades biogénicas (bacterias, hongos, nematodos, etc.) y abiogénicas (factores ambientales, deficiencias nutricionales, etc.). El impacto de cada enfermedad, varía entre continentes, países y zonas productoras; sin embargo, las principales enfermedades que afectan al cultivo de banano son: Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*), nematodo barrenador (*Radopholus similis* (Cobb) Thorne), y Moko bacteriano (*Ralstonia solnacearum* raza 2).

La Sigatoka negra 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 la Sigatoka negra se sustenta en el manejo integrado del cultivo, que considera: mejorar el drenaje del suelo, reducir la densidad de siembra (2000 plantas ha<sup>-1</sup>), 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 aspersion 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).

El objetivo de la presente investigación fue determinar la respuesta de sensibilidad a los fungicidas propiconazol y tridemorf en poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* que afectan al banano cv Gran Enano en Tabasco y Chiapas.

## **1.2 Revisión de literatura**

### **1.2.1 Importancia del cultivo**

Los plátanos y bananos son vitales para la seguridad alimentaria en muchos países tropicales y subtropicales, y es la fruta más popular en los países industrializados (Lescot, 2011). El banano es el cuarto cultivo más importante por su consumo mundial así como por su contenido de fuentes de carbono, almidón, vitaminas y minerales; su producción anual en el mundo asciende 102 millones de ton, en una superficie de 4 843 595 ha distribuidas en 120 países de zonas tropicales y subtropicales. Los principales países productores son India, Filipinas, China, Brasil, Ecuador e Indonesia; México ocupa el octavo lugar (FAOSTAT, 2012).

Los principales países importadores de bananas a nivel mundial son: Estados Unidos, Bélgica, Alemania, Rusia, Reino Unido y Japón. Mientras que los principales países exportadores de bananos son Ecuador, Bélgica, Colombia, Costa Rica, Guatemala. México exporta 45,000 toneladas anualmente, y solo representa el 3% de la producción nacional (FAOSTAT, 2012).

México, presenta una superficie de 78 130 ha, y una producción de 2'232,361 ton. Los principales estados productores se agrupan en tres regiones: Golfo de México que comprende los estados de Tabasco, Veracruz y Oaxaca; Pacífico Sur representado por Chiapas, y Pacífico Centro que abarca los estados de Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero y Nayarit (SIAP, 2011).

### 1.2.2 Descripción botánica

Los plátanos y bananos son plantas herbáceas gigantes, poliploides y perennes, monocotiledóneas pertenecientes al género: *Musa*, orden: Zingiberales, familia: Musaceae (D'Hont *et al.*, 2012). El proceso de domesticación inicio hace 7,000 años en el Sureste de Asia, esto implico la hibridación entre diversas especies y subespecies favorecido por las migraciones humanas, y selección de diploides y triploides sin semilla; así, los híbridos partenocápicos fueron ampliamente distribuidos por propagación vegetativa (Perrier, 2011).

El centro de origen del banano se extiende desde la India a Papua Nueva Guinea, incluyendo a Malasia e Indonesia (Simmonds, 1962; Daniells *et al.*, 2001). Las plantas de plátano y banano, triploides o tetraploides, presentan dos ancestros comunes: Dos especies diploides, *Musa acuminata* Colla (genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (genoma B) (Simmonds y Shepherd, 1955).

El género *Musa* está formado por cuatro secciones: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys y Eumusa. La sección Eumusa es la de mayor importancia económica y difusión geográfica, ya que en ella se incluyen los bananos y plátanos comestibles. En esta sección, las especies silvestres *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* son las más importantes porque por hibridación y poliploidía dieron origen a los plátanos y bananos cultivados. Se denomina con la letra "A" a las características semejantes a *M. acuminata* y con "B" a las *M. balbisiana*. En México se cultiva una gran variedad de clones e híbridos de Musáceas (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Descripción de los principales clones e híbridos cultivados en México.**

	Nombre	Grupo	Subgrupo
Clon	Enano gigante	AAA	Cavendish
	Manzano	AAB	
	Pera o cuadrado	ABB	
	Macho	AAB	Plantain
	Datil o ciento en boca	AA	
	Rombom / Rambao	AA	Cavendish
	Roatan	AAA	
	Enano chaparro	AAA	Cavendish
	Valery	AAA	Cavendish
	Morado	AAA	
	Morado verde	AAA	
	Dominico	AAB	Plantain
	Seda	AAB	
	Híbrido	FHIA-17 (BANANO)	AAAA
FHIA-23 (BANANO)		AAAA	Gros Michel
FHIA-20 (PLATANO)		AAAB	Francés
FHIA-21 (PLATANO)		AAAB	Francés
FHIA-03 (BANANO)		AABB	Bluggoe
FHIA-01 (BANANO)		AABB	Prata

Por otra parte, la planta presenta tres partes importantes: el cormo con hijuelos y el sistema radical, el pseudotallo con el sistema foliar, y la inflorescencia o racimo. El banano se propaga por rizomas subterráneos cuyos vástagos periódicamente producen hijuelos. La planta presenta un pseudotallo que está formado por las vainas foliares (Heslop y Schwarzacher, 2007). La emisión floral se produce de 7 a 9 meses después de la plantación, mientras que el período de desarrollo de la fruta es de 3 a 4 meses de acuerdo a las condiciones climáticas y edáficas (Simmonds, 1962).

### **1.2.3 Problemas fitosanitarios de bananos y plátanos**

Los bananos y plátanos son afectados por enfermedades que reducen el rendimiento y calidad del fruto. Los problemas fitopatológicos más importantes en México son: sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), nematodo barrenador (*Radopholus similis* (Cobb) Thorne), mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), moko del plátano (*Ralstonia solanacearum* raza 2), pudrición del cormo (*Erwinia* sp.) y mancha café por Cordana (*Cordana musae* A. Zimmerm.) (Orozco, *et al.*, 2001).

### **1.2.4 Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*)**

La Sigatoka negra es la enfermedad que más afecta la producción comercial de bananos (*Musa* AAA) y plátanos (*Musa* AAB) en la mayoría de las regiones productoras del mundo (Fullerton y Stover, 1990). En el Continente Americano, la Sigatoka negra se identificó por primera vez en Honduras en el año de 1972 (Stover y Dickson, 1976), de ahí se diseminó a todos los países de América Central, México y parte de América del Sur (Fullerton y Stover, 1990). La enfermedad se conoce en Asia y África como raya negra. En México se identificó por primera vez en los estados de Chiapas y Tabasco en 1981 (Contreras, 1983).



#### **1.2.4.1 Taxonomía**

*Mycosphaerella fijiensis* pertenece al reino fungi, clase Ascomycetes, subclase Loculoascomycetidae, orden Donthideales, familia Dophideaceae, género *Mycosphaerella*, especie *Mycosphaerella fijiensis* (Crous *et al.*, 2007).

#### **1.2.4.2 Agente causal**

El agente causal de la Sigatoka Negra tiene en su ciclo de vida un estado perfecto que es la fase ascógena o sexual y un estado imperfecto que es la fase conidial o asexual. El hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es el estado perfecto y pertenece a la clase Ascomycetae; el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, es el estado imperfecto y pertenece a la clase Hyphomycetae (Manzo, *et al.*, 2005; Crous *et al.*, 2007).

**Estado sexual.** *M. fijiensis* se caracteriza por la formación de peritecios, espermagonios y ascosporas. El peritecio y espermagonio ocurren en proporciones variables durante los estados 2 y 3 de desarrollo de los síntomas. Los espermagonios son más abundantes en el envés de la hoja al colapsar las lesiones, son oscuros, un poco errupentes, y de forma piriforme (Bennett and Arneson, 2003) y frecuentemente se desarrollan en la cámara subestomática; constituyen la parte masculina y en estado maduro contienen espermátida en forma de bastoncillos o varillas hialinas que actúan como gametos, que fertilizan a los peritecios que aparecen en los estados 5 y 6 de la enfermedad (Meredith y Lawrence, 1969). Los peritecios son estructuras anfígenas, globosas con un ostiolo esférico papilado, de paredes oscuras y células poligonales, ligeramente hundidos en el tejido de la hoja. Se presentan más frecuentemente en el

envés de las hojas y en su estado maduro contienen numerosas ascas bitunicadas que contienen ocho ascosporas cada una, como resultado del proceso sexual (Meredith y Lawrence, 1969). Las ascosporas son hialinas, fusiformes, biseriadas, septadas con una constricción leve al nivel del septo y clavadas en el asca con la parte más grande o prominente de la célula. El tamaño de las ascosporas es de 11.5 a 15.6 x 2.5 a 5.0  $\mu\text{m}$  con un promedio de 13,7 x 3.7  $\mu\text{m}$  (Mulder y Stover, 1976); germinan en ambos lados de la superficie de las hojas y penetran al tejido del hospedero a través de los estomas. Las hojas infectadas densamente, liberan las ascosporas durante un periodo de dos a cuatro semanas más en comparación cuando las hojas se cortan (saneamiento) y se colocan en el suelo (Marín *et al.*, 2003). Las ascosporas son la fuente principal de inóculo de la enfermedad (Stover, 1980), puesto que son diseminadas por el viento y depositadas principalmente en la hoja “cigarro” y en las cuatro hojas más jóvenes de la planta (Mulder y Stover, 1976).

**Estado asexual.** *Paracercospora fijiensis* se caracteriza por producir conidios individuales y apicales en el conidióforo, son hialinos, obclavados a cilíndricos, rectos a ligeramente curvos, con 6 a 9 septos, delgados en el ápice (30 a 132  $\mu\text{m}$ ) y más anchos en la base (2.5 a 5  $\mu\text{m}$ ) con una cicatriz en el hilum basal del conidio (Meredith y Lawrence, 1969). Los conidióforos pueden emerger directamente por el estoma de manera individual o en grupos, o bien pueden formarse a partir de células del estroma de color oscuro y son fácilmente vistos en el estado 2 de la enfermedad (Mulder y Stover, 1976). Los conidióforos, resultado de la reproducción asexual, son septados de 0 a 5 septos y 16.5 a 62.5  $\mu\text{m}$  de longitud por 4 a 7  $\mu\text{m}$  de ancho. A partir de un solo conidióforo pueden formarse cuatro conidios maduros (Meredith y Lawrence, 1969).

### **1.2.4.3 Patogénesis**

Las esporas de Sigatoka Negra se desplazan con el viento, lluvia y rocío de agua, las cuales son la principal fuente de infección (Marín *et al.*, 2003). Las ascosporas y conidios germinan en la hoja (Stover y Simmonds, 1987), y posteriormente presentan un crecimiento epifítico de los tubos germinativos, los cuales penetran a través del estoma, y proliferan en el tejido intercelular de la hoja (Meredith y Lawrence 1969). El patógeno establece una relación biotrófica durante 3 a 4 semanas previo a la aparición de síntomas necróticos (Hoss *et al.*, 2000). La enfermedad se desarrolla favorablemente cuando existe humedad relativa y precipitación alta; mientras que temperaturas menores a 20 °C y periodos secos inhiben el crecimiento del hongo (Craenen, 1998). Meredith y Lawrence (1969) y Fouré (1985) identificaron seis estados de evolución de síntomas de la enfermedad: 1) Estado de punto inicial: aparición de puntos pequeños de color amarillo pálido de 0.25 mm de diámetro visibles en el envés de la hoja; 2) Primer estado de estría. La estría es de color castaño de 1 mm de ancho por 2 mm de largo, visibles en el haz y paralelas a las venas laterales de la hoja; 3) Segundo estado de estría: las estrías se alargan hasta alcanzar 20-25 mm de longitud y 2 mm de ancho, las cuales toman una coloración marrón oscuro y son visibles en el envés como rayas amarillas; 4) Primer estado de mancha. Las estrías se amplían y se tornan color marrón oscuro y son rodeadas por una zona amarilla pálida; 5) Segundo estado de mancha. La mancha inicia un colapso y se forma un halo amarillo ligero, el cual rodea el borde acuoso de la mancha; 6) Tercer estado de mancha: El centro de la mancha se seca, adquiere un color gris claro y es rodeada por un halo amarillo brillante y por un borde oscuro.

#### **1.2.4.4 Epidemiología**

Sigatoka negra presenta un alto nivel de correlación entre los cambios en la evolución de la enfermedad y factores climáticos como la lluvia, humedad relativa, y evaporación, y son los responsables de la disponibilidad y la germinación del inóculo ascospórico y conidial e infección de las hojas. La velocidad de la evolución de la enfermedad, depende del comportamiento de la temperatura del aire y de la cantidad y duración del rocío y la lluvia (Pérez, *et al.*, 2000).

#### **1.2.4.5 Impacto sobre la fisiología de la planta**

La Sigatoka Negra deteriora el área foliar de la planta, retrasa la floración y la cosecha y reduce tanto el llenado del racimo como la vida verde de la fruta (Craenen y Ortíz, 2003); además induce la producción de etileno y madurez prematura de frutos y reduce la producción de fruta en un 38% (Marín *et al.*, 2003). Lo anterior afecta el llenado de la fruta, dando como resultado racimos con bajo número de manos y frutos de calibre y peso muy por debajo de los estándares de comercialización (Belalcázar *et al.* 1998). *M. fijiensis* produce una toxina que afecta a la planta (Molina y Krausz, 1989). La severidad de la enfermedad afecta la tasa fotosintética y tasa respiratoria de la planta (Hidalgo, *et al.*, 2006). La caída de la tasa fotosintética foliar en función del porcentaje de severidad de la Sigatoka Negra, es consecuencia del aumento de la respiración foliar, debida al costo energético que representa la defensa de la planta contra el patógeno, efecto que se acentúa con la producción de estructuras reproductivas del hongo (Arauz 1998).

#### **1.2.4.6 Interacción *Mycosphaerella fijiensis* – *Musa spp***

La clasificación de los genotipos de *Musa spp.* con relación a la resistencia a la enfermedad ha sido el resultado de la caracterización de las interacciones planta-patógeno. Esta interacción inicia cuando las ascosporas o conidios de *M. fijiensis* llegan e inician la penetración a los espacios intercelulares del parénquima de la hoja, a través de estomas (Beveraggi *et al.*, 1995). De acuerdo al resultado de esta interacción, los cultivares se han clasificado en tres categorías: los altamente resistentes que bloquean tempranamente la infección (interacciones incompatibles), los parcialmente resistentes que desarrollan los síntomas lentamente (interacciones compatibles), y los susceptibles que desarrollan los síntomas rápidamente (interacciones compatibles) (Lepoivre *et al.*, 2002).

#### **1.2.4.7 Manejo de la Sigatoka Negra**

La aparición de Sigatoka Negra en las áreas bananeras provocó cambios en el manejo de las plantaciones, especialmente en los programas de aspersion de fungicidas para su combate. En México, hasta antes de la década de los 80, la enfermedad conocida como chamusco o Sigatoka amarilla (*M. musicola*) era el problema fitosanitario más importante que afectaba el follaje del cultivo. Este patógeno no requería de un programa estricto de aspersion de fungicidas. Sin embargo, con la introducción de la Sigatoka Negra a territorio nacional se modificaron notablemente estos programas de control, por lo que hubo necesidad de utilizar fungicidas más potentes y con intervalos de aplicación más cortos. Asimismo, hubo cambios en el manejo de las plantaciones

con tendencia a una mayor tecnificación del cultivo (nutrición, densidad de población, deshije, deshoje, control de plagas, enfermedades y malezas), lo que trajo como consecuencia un incremento en el rendimiento y calidad del fruto por unidad de superficie. En la actualidad, el combate químico es la opción más viable para el control de Sigatoka Negra en los clones de banano más comerciales en México (Orozco y Orozco, 2001). El manejo de Sigatoka Negra en plantaciones comerciales de banano en el mundo es altamente dependiente del uso de fungicidas, los cuales son apoyados con prácticas culturales de cultivo (deshoje, deshije, drenaje, control de malezas y nutrición) para reducir fuentes de inóculo y evitar condiciones favorables para el desarrollo del patógeno. Hasta 1995, en México el combate químico de la enfermedad se realizaba mediante el uso de fungicidas de acción sistémica del grupo de los triazoles (Tebuconazole, Propiconazol, Bitertanol, Fenbuconazole y Hexaconazol), benzimidazoles (Benomyl, Carbendazim y Metil tiofanato), morfolinás (tridemorph) y estrobilurinas (Azoxistrobin) (Orozco *et al.*, 2001). Asimismo, los fungicidas de contacto o protectivos (Clorotalonil y Mancozeb) también eran incluidos en los programas de aspersión. A partir de 1995, hubo cambios notables en los programas de control al incrementarse el uso de fungicidas protectantes en todas las áreas productoras de México (Escudero y Rendón, 1996). En estos programas se realizan aplicaciones periódicas de 7 a 14 días, con el propósito de proteger de la enfermedad cada hoja que va emergiendo (Orozco *et al.*, 2008).

### **1.2.5 Manejo de la enfermedad**

Las medidas de control para la Sigatoka negra se pueden clasificar en directas e indirectas. Las directas consisten en evitar la entrada de la enfermedad a un área, región o país libre de la misma y las indirectas se refieren a convivir con la enfermedad, evitando los daños producidos mediante el combate químico, cultural o genético.

#### **1.2.5.1 Control cultural**

El control cultural de la Sigatoka negra está dirigido a reducir las fuentes de inóculo del patógeno y modificar las condiciones de microclima dentro del huerto que puedan favorecer el desarrollo de la enfermedad. Este método es una parte fundamental en el manejo de la enfermedad e incluye prácticas agronómicas como el saneamiento, fertilización adecuada, manejo del riego, drenaje eficiente, control de malezas, deshije, densidad de plantas y supervisión de la plantación (Orozco *et al.*, 2008; Pérez, 1998).

Estas prácticas además de mejorar las estrategias de manejo de Sigatoka negra, también optimizan las condiciones del cultivo y pueden tener un efecto directo sobre la respuesta de las plantas a la incidencia y severidad de la enfermedad (Orozco *et al.*, 2008).

#### **1.2.5.2 Control biológico**

En general, el control biológico de la Sigatoka negra representa un gran desafío, debido a la naturaleza policíclica de la enfermedad, la presencia de plantas de todas las edades y la emergencia de hojas susceptibles cada 6 a 12 días (Marín *et al.*, 2003). Se

han realizado estudios tendientes a fomentar las poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas de ocurrencia natural en el filoplano de banano, mediante la aplicación de sustratos (Melaza + quitina + leche) y (quitina + glucano + nitrato de calcio) alternados con la aplicación de fungicidas tradicionales y se ha logrado reducir en un 40% la aplicación de los mismos (Arango, 2002). El uso de algunas cepas de *Bacillus cereus* y *Serratia entomophila* en combinación con fungicidas sistémicos y de contacto, redujeron en un 60% la enfermedad (Orozco *et al.*, 2001). Más recientemente se probó el efecto antagónico de 8 cepas de *Trichoderma* spp. contra *Mycosphaerella fijiensis*, de las cuales 6 cepas lograron un buen control *in vitro* del patógeno y solo 2 cepas mostraron resultados aceptables en invernadero (Arzate, 2006).

#### **1.2.5.3 Control genético**

Desde el punto de vista de reducción de costos de producción y de saneamiento ambiental, el empleo de variedades resistentes es una de las mejores alternativas que tienen los productores para enfrentar las diferentes plagas (Merchán, 2002). Los estudios referentes a este tema han estado en caminados al mejoramiento de algunos plátanos diploides con excelentes características agronómicas y resistencia a Sigatoka negra. Estas especies diploides fueron cruzadas con trípodas que poseen semillas fértiles para obtener híbridos tetraploides con resistencia a Sigatoka negra como los híbridos FHIA 01, FHIA 02 (Orozco *et al.*, 2001).

La ingeniería genética también ha contribuido de una manera sin precedentes para la generación de plantas que al menos en ensayos preliminares han mostrado cierta resistencia/tolerancia al hongo. Por otra parte, se han generado plantas transgénicas de



plátano cv. Gran Nain conteniendo genes que codifican para proteínas antifúngicas y se observó que los extractos crudos de estas plantas inhibieron el crecimiento de *Fusarium* spp. *in vitro* (Gómez *et al.*, 2002).

#### **1.2.5.4 Control químico**

La aparición de sigatoka negra en las áreas bananeras provocó cambios en el manejo de las plantaciones, especialmente en los programas de aspersión de fungicidas para su combate. Se modificaron notablemente estos programas de control, por lo que hubo necesidad de utilizar fungicidas más potentes y con intervalos de aplicación más cortos. El control químico es la táctica más utilizada y costosa para el manejo de la sigatoka negra en cultivos destinados a la producción de fruta para mercados nacionales y de exportación (Merchán, 2002). El control se realiza mediante la aplicación de fungicidas protectantes y sistémicos, apoyado con algunas prácticas de cultivo, como la eliminación de las hojas en el momento en que llega la etapa de madurez de la enfermedad (Marín *et al.*, 2003), nutrición, riego, drenaje, control de malezas, entre otras (Orozco, 1998). Para evitar el desarrollo de resistencia de *M. fijiensis* a los fungicidas sistémicos, estos se aplican en combinación o de forma alternada con fungicidas protectantes de amplio espectro como mancozeb y clorotalonil (Romero y Sutton, 1997). Otros fungicidas de uso extensivo para el control de sigatoka son: clorotalonil, compuestos de cobre y fungicidas sistémicos como: triazoles, estrobirulinas, anilopirimidias, aminas, benzimidazoles (de Lapeyre *et al.*, 2010) e inductores de resistencia como el acibenzolar-S-metil. Sin embargo, en algunos lugares

del mundo se ha observado resistencia de la Sigatoka a las moléculas benomil y propiconazole (Romero y Sutton, 1998).

#### **1.2.5.5 Impacto económico y ambiental.**

*Mycosphaerella fijiensis*, causante de la Sigatoka Negra, afecta de manera significativa al cultivo del banano, al aumentar los costos de producción y reducir la relación beneficio/costo de los productores. Se estima que el combate de Sigatoka Negra ocupa entre un 35 a 45% del total de costos de producción del cultivo, anualmente se gastan alrededor de 500 millones de pesos (43.5 millones de dólares) para el combate de Sigatoka Negra (Orozco *et al.*, 2001).

Por otra parte, en México, el mancozeb es el principal fungicida de contacto utilizado para el control de Sigatoka negra; pero, su uso intensivo, estimado en 52 aplicaciones por año, ha originado acumulación severa de Mn y etilen-etiourea en sedimentos de aguas superficiales (Melgar, *et al.*, 2008) que implica riesgos a la salud humana y ambiente (Pastorelli *et al.*, 1995). En Costa Rica, se han registrado residuos de Mancozeb de 0.77 a 2.38  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  en canales después de una aplicación (Mortensen *et al.*, 1998). Otro fungicida de uso intensivo, es el propiconazol, el cual se ha encontrado en áreas bananeras de Costa Rica, a concentraciones de 24.2  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de agua (Mortensen *et al.*, 1998).

## **1.2.6 Reducción del inóculo**

### **1.2.6.1 Deshoje**

La remoción de hojas, altamente infectadas por la Sigatoka negra, es una práctica reconocida y comúnmente realizada dentro de las plantaciones comerciales de banano (Guzmán y Romero, 1995). El propósito de esta práctica es eliminar de manera total o parcial el tejido foliar afectado de las plantas con la finalidad de reducir la fuente de inóculo dentro de la plantación. La eliminación total o parcial de las hojas depende del grado de infección en las mismas. Si la infección es parcial y no rebasa el 40% del área foliar enferma se sugiere eliminar solo el tejido afectado. En cambio, si el grado de infección es mayor del 40% del área foliar destruida se debe eliminar toda la hoja (Jacome, 1998; Orozco-Santos, 1998). Esta medida reduce el periodo en el cual estas hojas están produciendo inóculo y tiene un impacto importante en la cantidad de ascosporas que potencialmente pueden alcanzar las nuevas hojas que emergen. Las hojas podadas depositadas en la superficie del suelo, son sometidas a descomposición, y como promedio puede obtenerse una reducción de 6 a 8 semanas, del período total de producción de ascosporas. Además de esto la superposición de las hojas en el suelo reduce mecánicamente la disponibilidad de inóculo (Guzmán y Romero, 1995; Pérez, 1998).

### **1.2.6.2 Minicomposteo**

Los desechos de las plantas (hojas dobladas, tejido eliminado por el saneo y residuos de cosecha) se esparcen en toda la plantación, lo cual presenta dos inconvenientes: 1)

si son hojas con Sigatoka negra: éstas al humedecerse con el agua de riego y lluvia provocan un ambiente favorable que estimula la maduración de los pseudotecios y la esporulación. 2) cuando se deja la hojarasca esparcida en toda la plantación su degradación es muy rápida, lo que conduce a una generación de procesos anaeróbicos por la ausencia de oxígeno, y provoca el crecimiento de microorganismos que impermeabilizan y compactan el suelo, el crecimiento de la microflora es lento y solo reciclan los elementos vitales presentes, sin atacar los minerales insolubles. Con este manejo de hojarasca se incorpora una reducida cantidad de materia orgánica (Orozco *et al.*, 2008). Una alternativa viable es el minicomposteo, el cual consiste en hacer montones con todos los desechos de las plantas de banano dentro de la plantación. La hojarasca, porciones de hojas que son cortadas y las plantas eliminadas después de la cosecha son apiladas en montones para provocar una rápida degradación y sirvan como aporte de nutrimentos y materia orgánica. Todos los tejidos (hojas y pseudotallo) deben ser cortados para lograr una eficiente descomposición. Los montones de desechos deben hacerse entre las calles a una distancia de 5 a 6 metros (Orozco-Santos *et al.*, 2009).

### **1.2.6.3 Aplicación de urea**

La aplicación de urea al 5% y las mezclas de urea con glifosato y clorotalonil, redujeron sustancialmente la capacidad de esporulación del hongo hasta en un 80% en relación al testigo. Sin embargo se ha observado que al someter este mismo material a incubación y luego a descarga por segunda vez el efecto inhibitorio sobre la esporulación se reduce en un 30-40% (Guzmán y Romero, 1995). En otro estudio se señala que la

aplicación conjunta de cera y urea al 5% disminuyó sustancialmente la esporulación del hongo, además de que este efecto tendió a ser más persistente en el tiempo (Guzmán y Romero, 1995). En un experimento conducido en Costa Rica se observó que la capacidad de esporulación de las lesiones maduras de *M. fijiensis* no fue mayor a 36 días, dándose el pico máximo de esporulación en los primeros 15 días y se demostró que la aplicación semanal de urea al 10% es una alternativa práctica para reducir aún más las posibilidades de multiplicación del patógeno, sobre todo en condiciones de alta presión del inóculo (Villalta y Guzmán, 2005).

### 1.3 Literatura citada

- Arango, O. M. 2002. Alternativas de manejo para el control biológico de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (Musa AAA). Memorias de la XV Reunión ACORBAT 2002. Cartagena de Indias, Colombia. pp. 130-134.
- Arauz L.F. 1998. Fitopatología; un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 467 p.
- 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.
- Arzate V.J., Michel A.A., Domínguez M.V., Santos E. O. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. Sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del plátano (Musa sp.) in vitro e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 98-104.
- Belalcázar *et al.* 1998. Sistemas de producción. En Memorias Seminario Internacional sobre la producción del plátano. Armenia, CO. Mayo 1998. CORPOICA p 137-146.
- Beveraggi, A., Mourichon, X., et Sallé, G. 1995. Étude compare des premières étapes de l'infection chez des bananiers sensibles et résistants infectés par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladies des raies noires. *Canadian Journal of Botany* 73:1328-1337.

- Chen, Y; Aviad, T. 1990. Effects of Humic Substances on Plant Growth. Seagram Center for Soil and Water Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel.
- Chillet, M., C. Abadie, O. Hubert, Y. Ch. Chilin, and D.B.L. De Lapeyre. 2009. Sigatoka disease reduces the greenlife of bananas. *Crop Protection* 28: 41-45.
- Chin, K. M., M. Wirz, and D. Laird. 2001. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Disease* 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. *Molecular Plant Pathology* 12: 307-328.
- Contreras, M. de E.M. 1983. El chamusco negro (sigatoka) una nueva enfermedad de la hoja de los plátanos. Universidad Autónoma de Chapingo. México. *Revista de Geografía Agrícola* 4: 61-102.
- Craenen, K., 1998. Black sigatoka disease of banana and plantain. A Reference Manual. International Institute of Tropical Agriculture. Ibadam, Nigeria. 58 p.
- Craenen K., and Ortíz R. 2003. Genetic improvement for a sustainable management of resistance, pp. 181-198. *In*: Jacome L; Lepoivre P; Marin D; Ortiz R; Romero R; Escalant JV (eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 Mayo 2002. INIBAP, Roma.
- Crous, P. W., U. Braun, and J. Z. Groenewald. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1-32.

- Daniells, J.W., Jenny, C., Karamura, D.A., Tomekpe, K., Arnaud, E., Sharrock S. (eds) 2011. Musalogue: A catalogue of Musa germoplasm. Diversity in the genus Musa. Montpellier, France: INIBAP.
- D'Hont, A., Denouéud, F., Marc, A. J., Cristophe, B. F., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, S., Droc, G., Rouard, M., Da Silva, C., Jabbari, K., Cardi, C., Poulain, J., Suquert, M., Labadie, K., Jourda, C., Lengelle, J., Rodier, M., Alberti, A., Bernard, M., Correa, M., Ayyampalayam, S., Mckain, M., Mack, J.L., Leebens, M. J., Barbosa, J., Bova, E. H., Heslop, H. P., Habas, R., Rivallan, R., Francois, P., Poiron, C., Kilian, A., Burthia, D., Jenny, C., Bakry, F., Brown, S., Guignon, V., Kema, G., Dita, M., Waalwijk, C., Joseph, S., Dievart, A., Jaillon, O., Leclercq, J., Argout, X., Lyons, E., Almeida, A., Jeridi, M., Dolezel, J., Roux, N., Risterucci, A.M., Weissenbach, J., Ruiz, M., Glaszmann, J.C., Quetier, F., Yahiaoui, N., and Wincker, P. 2012. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. Nature:1-7.
- De Lapeyre, de B. L., Foure, E., Abadie, C., and Carlier, J. 2010. Black leaf streak disease is challenging the banana industry. Fruits. 65(6):327-341.
- Escudero, M.C. and Rendón, E.C. 1996. Integrated management experiences with black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) and non-systemic fungicides in Soconusco, Chiapas, Mexico. XII Meeting ACORBAT. Santo Domingo, República Dominicana (Abstract). p. 53.
- FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2012. Estadísticas internacionales y nacionales en producción de bananos.



- Fouré, E. 1985. Black Leaf Streak Disease of Bananas and Plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), Study of the Symptoms and Stages of the Disease in Gabon. IRFA. Paris, France. 23 p.
- Fullerton, R.A. and Stover, R.H. (Eds.). 1990. Sigatoka leaf spot diseases of bananas: Proceedings of an international workshop. INIBAP. San José, Costa Rica. 374 p.
- Heslop, H. J.S., Schwarzacher, T. 2007. Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of botany* 100:1073-1084.
- Hidalgo M., Tapia A., Rodríguez W., Serrano E., 2006. Efecto de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA,Cv.Valery). *Revista Agronomía Costarricense* 30: pp 35-41. San José, Costa Rica.
- Hoss, R., Helbig, J., and Bochow, H. 2000. Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*). *Journal of Phytopathology* 148:387-394.
- Kablan, L., Lagauche, A., Delvaux, B., and Legreve, A. 2012. Silicon reduces black Sigatoka development in banana. *Plant Disease* 96(2):273-278.
- Lepoivre, P., Busogoro, J.P., El Hadrami, A., Carlier, J., Harelimana, G., Mourichon, X., Panis, B., Stella R.A., Roux, N., Sallé, G., Strosse, H., and Swenen, R. 2002. Banana-*Mycosphaerella fijiensis* (black leaf streak disease) interactions. In: *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on *Mycosphaerella fijiensis* leaf spot*

diseases of bananas. INIBAP. CORBANA. CATIE, San José, Costa Rica, 20-23 May, 2002. 317 p.

- Lescot, T. 2011. The genetic diversity of banana in figures. *FruiTrop* 189:58-62.
- Manzo S.G., Guzmán G.S., Rodríguez G.C., James J., Orozco S.M. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa spp.* *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 87-96. Ciudad Obregón, México.
- Marín, D.H., Romero, R.A., Guzmán, M., and Sutton, T.B. 2003. Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87:208-222.
- Merchán V.V. 2002. Manejo integrado de plagas del plátano y el banano. ICA Seccional Caldas. *Epidemiología Agrícola*. A.A. 876 Manizales, Colombia. P 353-361.
- Meredith, D.S., and Lawrence, J.S. 1969. Black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society* 52:459-476.
- Molina G.C., Krausz J.P. 1989. A Phytotoxic activity in extracts of broth cultures of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and its use to evaluate host resistance to black sigatoka. *Plant Disease* 73: 142-144.
- Mortensen, S.R., Johnson, K.A., Weisskopf, C.P., Hooper, M.J., Lacher, T.E., and Kendall, R.J. 1998. Avian exposure to pesticides in Costa Rican banana plantations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60:562-568.
- Melgar, C., Geissen, V., Cram, S., Sokolov, M., Bastidas, P., Ruiz, S. L. E., Que Ramos, F. J., and Jarquín, S. A. 2008. Pollutants in drainage channels following

long-term application of Mancozeb to banana plantations in southeastern Mexico. *Journal of Plant Nutrition Soil Science*. 171:597-604.

- Mulder, J.L., and Stover, R.H. 1976. *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. *Transactions of the British Mycological Society* 67:77-82.
- Nelson, E.B. 1991. Handbook of applied Mycology. Pp. 327-255. In: D.K. Arora, B.Rai, K.G. Mukerji, and G.R. Knudsen (eds). *Current Limits to Biological Control of Fungal Phytopathogens*. Volume 1. Soil and Plants. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 800 p.
- 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. *Tropical plant pathology* 33: 189-196.
- Orozco-Santos, M., Farías-Larios, J., Manzo-Sánchez, G., and Guzmán, González, S. 2001. Black sigatoka disease (*Mycosphaerella fijiensis*) in Mexico. *INFOMUSA* 10(1):33-37.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology and Potential for Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54
- Pastorelli, R., Allevi, R., Romagnano, S., Melli, G., Fanelli, R., and Airoldi, L. 1995. Gas chromatography mass spectrofotometry determination of ethylenethiourea hemoglobin adducts: A possible indicator of exposure to ethylene bis dithiocarbamate pesticides. *Achiev. Toxicology*. 69:306-311.
- Pérez V.L., Hernández M.A., Porrás G.A. 2000. Epidemiología de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba. II. Pronóstico bio-climático de los

- tratamientos de fungicidas contra la enfermedad en plátanos (*Musa* spp. AAB).  
Revista Mexicana de Fitopatología 18: 27-35. Ciudad Obregón, México.
- Perrier, X. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* sp.) domestication. 2011. Proc.Natl. Sci. USA. 108:11311-11318.
  - Romero A.R. and Sutton B.T. 1998. Characterization of Benomyl Resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. Plant Disease 82:931-934.
  - SIAP-SAGARPA. 2011. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Estadísticas nacionales de producción de bananos. México.
  - Sánchez Rodríguez R., J.A. Pino Algora, C. Vallin Plous, M.E. Pérez Rodríguez, Y. Iznaga Sosa & F. Malpartida Romero. 2002. Efecto del fungicida natural F20 contra la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (AAB) y banano (AAA). INFOMUSA 11(1):14-16.
  - Simmonds, N. W., and Shepherd, K. 1955. Taxonomy and origins of cultivated bananas. Journal of the Linnean Society of London Botany 55:302-312.
  - Simmonds, N. W.1962. Evolution of bananas. Londos: Longmans, Green & Co.
  - Soto, M. 2000. Bananos; Cultivo y Comercialización. 3ra edición (Disponible CD).
  - Stover, R.H. 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantain. Plant Disease 64: 750-756.

- Stover, R.H. and Dickson, J.D. 1976. Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* var. *difformis*: a comparison of the first Central American epidemics. FAO Plant Protection Bulletin 24:36-42.
- Stover, R.H. and Simmonds, N.W. 1987. Bananas (third edition), Longman Scientific and Technical. New York, USA.468 p.
- Turner, W. 1985. Fertilizing bananas-nitrogen, phosphorus and potassium. AGFACTS h6.3.7. Departament of agriculture. NSW.
- Vélez E.J. y Castaño Z.J. 2005. Manejo de las enfermedades causadas por *Mycosphaerella* spp. Mediante la aplicación de ácidos fúlvicos. InfoMusa - Vol. 14 N°2 Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Colombia.
- Wong, C., Kiew., R., Argent, G., Set, O., Lee, S.K., Gan, Y.Y. 2002. Assessment of the validity of the sections in *Musa* (Musaceae) using AFLP. Annals of Botany 90:231-238.

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

## CAPITULO II

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

Luciano Martínez Bolaños, D. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

#### 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<sup>®</sup>) adicionados con diferentes concentraciones del fungicida. Los medios se inocularon con 100  $\mu$ 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 (CE<sub>50</sub>) y 95% (CE<sub>95</sub>) para cada aislamiento se estimó mediante análisis Probit del porcentaje de inhibición del crecimiento relativo del patógeno. Los valores CE<sub>50</sub> en propiconazol variaron de 0.0001 a 0.95 mg L<sup>-1</sup>; y los de CE<sub>95</sub> de 0.006 a 12.51 mg L<sup>-1</sup>. La proporción de resistencia en el nivel CE<sub>95</sub> fue superior a 2,085 $\times$ , para el aislamiento MF-RmC<sub>2</sub> de la finca Remedios en Teapa, Tabasco. Los

valores para  $CE_{50}$  en tridemorf variaron de 0.00001 a 0.002 mg L<sup>-1</sup> y los de  $CE_{95}$  de 0.03 a 0.85 mg L<sup>-1</sup>. La proporción de resistencia a nivel  $CE_{95}$  entre el aislamiento sensible de referencia y el menos susceptible (MF-RcC<sub>5</sub> de la finca el Recreo, Tabasco) fue superior a 28.3×. La correlación positiva entre el número de aplicaciones y los valores de  $CE_{50}$  y de  $CE_{95}$  son indicativos de que la presión de selección ejercida en esta plantación generó resistencia al propiconazol.

**Palabras clave:** Sigatoka negra, propiconazol, tridemorf, banano, plátano.



# FUNGICIDES RESISTANCE IN *Mycosphaerella fijiensis* POPULATIONS OF SOUTHEASTERN MEXICO

Luciano Martínez Bolaños, D. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

## ABSTRACT

The control of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) of banana (*Musa acuminata* Colla AAA) and (*Musa balbisiana* Colla AAB) requires numerous applications of fungicides, principally of the triazoles groups that induce high selection pressure in populations of the pathogen. The objective of the present study was to determine the response of strains of *Mycosphaerella fijiensis* isolated in banana plantations of Tabasco and Chiapas, Mexico, to propiconazol and tridemorph. The bioassays were carried out in potato dextrose agar (PDA) culture medium added with different concentrations of the fungicide. The media were inoculated with 100  $\mu$ 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 (EC<sub>50</sub>) and 95 % (EC<sub>95</sub>) was estimated through Probit analysis of the percentage of inhibition of the relative growth of the pathogen. The EC<sub>50</sub> values in propiconazol varied from 0.0001 to 0.95 mg L<sup>-1</sup> and those of EC<sub>95</sub> from 0.006 to 12.51 mg L<sup>-1</sup>. The proportion of resistance in the level of C<sub>95</sub> was higher than 2085<sub>x</sub>, for the isolate MF-RmC<sub>2</sub> of the Remedios plantation in Teapa, Tabasco. The values for EC<sub>50</sub> in tridemorph varied from 0.00001 to 0.002 mg L<sup>-1</sup> and those of EC<sub>95</sub> from 0.03 to 0.85 mg L<sup>-1</sup>. The proportion of resistance to level EC<sub>95</sub> between the sensitive isolate of reference

and the least susceptible (MF-RcC<sub>5</sub> of the Recreo plantation, Tabasco) was higher than 28.3x. The positive correlation between the number of applications and the values of EC<sub>50</sub> and of EC<sub>95</sub> are indicative that the selection pressure exerted in this plantation generated resistance to the propiconazol.

**Key words:** Black Sigatoka, propiconazol, tridemorph, banana, plantain.

## 2.1 Introducción

*Mycosphaerella 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<sup>-1</sup>), 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 aspersion 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. En varios estudios se muestra 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 han documentado cambios significativos en la respuesta a morfolinas, a pesar de ser 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.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Aislamiento e identificación de los aislamientos**

El aislamiento de cepas de *M. fijiensis* se realizó de 2009 a 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 2). 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.

### **2.2.2 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.

**Cuadro 2. 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.**

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 <sub>13</sub>	Mulato	Pichucalco, Chiapas.	N 17°41'88.2" O 93°02'16.5"	36 mancozeb
EbC <sub>1</sub> , EbC <sub>5</sub>	EbC <sub>4</sub> , La Elba	I. López Rayón, Teapa, Tabasco	N 17°38'63" O 92°57'58.7"	48 mancozeb; 2 triazol
JgC <sub>1</sub> , JgC <sub>3</sub>	JgC <sub>2</sub> , Jaguar	I. López Rayón, Teapa, Tabasco	N 17°37'94.1" O 92°58'61.7"	48 mancozeb; 2 estrobirulina; 1 triazol
Rc1C <sub>3</sub> , Rc1C <sub>4</sub> , Rc1C <sub>5</sub> , Rc1C <sub>6</sub>	Recreo	I. López Rayón, Teapa, Tabasco	N 17°38'58.7" O 92°57'97.8"	28 mancozeb, 3 clorotalonil, 3 morfollinas; 3 benomilo 48 mancozeb; 3 triazol
RmC <sub>1</sub> , RmC <sub>2</sub> , RmC <sub>4</sub> , RmC <sub>5</sub>	Remedios	J. Ma. Mor. y Pavón, Teapa, Tabasco	N 17°37'2.7" O 92°56'20.7"	
MrC <sub>1</sub> , MrC <sub>2</sub> , MrC <sub>3</sub> , MrC <sub>4</sub>	Miranda	I. López Rayón, Teapa, Tabasco	N 17°37'15.7" O 92°57'70.7"	48 mancozeb
AlgC <sub>1</sub> , AlgC <sub>3</sub> , AlgC <sub>4</sub> , AlgC <sub>5</sub>	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

La identificación y confirmación de la especie se realizó con los iniciadores específicos MF137 (5'-GGCGCCCCCGGAGGCCGTCTA-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 (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 MgCl<sub>2</sub>, 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®).

### **2.2.3 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 i.a. L<sup>-1</sup>; Syngenta Agro S.A. de C.V.) y Calixin® CE (Tridemorf, concentrado emulsionable 860 g de i. a. L<sup>-1</sup>; 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<sup>-1</sup>. Después se agregaron 10 mL de la concentración respectiva en 190 mL de PDA y vaciaron en cajas Petri. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. El experimento completo se repitió dos veces.

El estudio se realizó con una población de 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®.

#### **2.2.4 Análisis estadístico**

El estudio se realizó con un diseño experimental completamente al azar. La concentración efectiva 95 % (CE<sub>95</sub>), concentración efectiva 50 % (CE<sub>50</sub>), límites de confianza (LC) y proporción de resistencia (PR) se determinó mediante el procedimiento Proc Probit (SAS Institute, 2003). La proporción de resistencia se obtuvo al dividir el valor de la CE<sub>95</sub> 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 y Preisler, 1992). La correlación entre la CE<sub>95</sub> y frecuencia de aplicaciones en campo de fungicidas sistémicos (según Cuadro 1) para el manejo de Sigatoka negra se determinó usando el coeficiente de Pearson (SAS Institute, 2003).



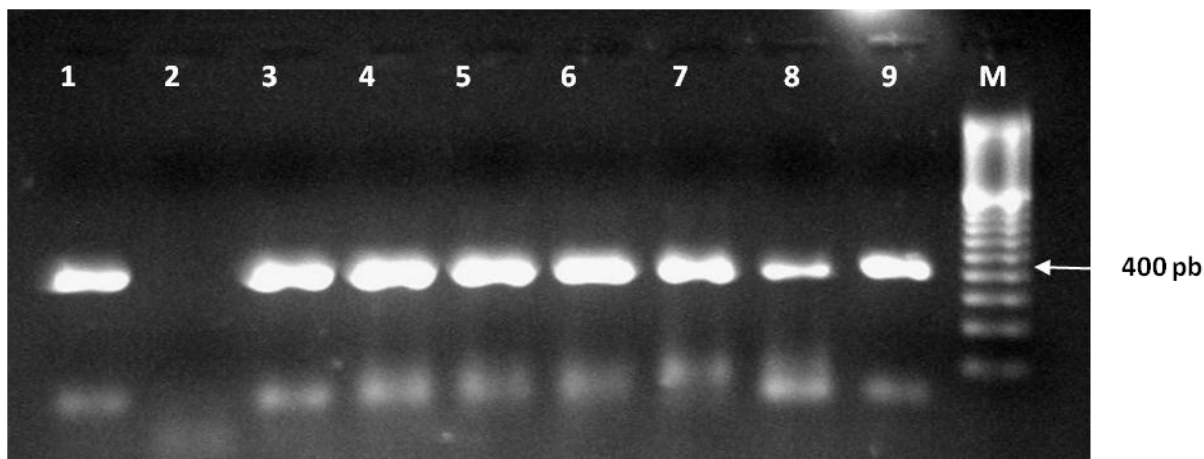
## **2.3 Resultados y discusión**

### **2.3.1 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.

### **2.3.2 Caracterización molecular de aislamientos**

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



**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®).

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

#### 2.3.3.1 Respuesta al propiconazol

La concentración efectiva 50 % ( $CE_{50}$ ) que presentó *M. fijiensis* a propiconazol fue de 0.0001 a 0.095 mg L<sup>-1</sup> y la  $CE_{95}$  de 0.006 a 12.51 mg L<sup>-1</sup>. Los aislamientos de la finca Remedios de Tabasco tuvieron la mayor  $CE_{95}$ , con valores de 9.49 a 12.51 mg L<sup>-1</sup>. 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-AlgC<sub>3</sub> (> 2,085×) (Cuadro 3).

Estos resultados coincidieron con Romero y Sutton (1997) quienes caracterizaron la sensibilidad de *M. fijiensis* a propiconazol en Costa Rica, con valores de  $CE_{50}$  entre 0.06 y 0.05 mg L<sup>-1</sup> para poblaciones con historial de aplicaciones de propiconazol y 0.008 mg L<sup>-1</sup> en susceptibles, con un  $PR_{50}$  de 6.0x y 7.5x. 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  $CE_{50}$  de 0.0001 a 0.001 mg L<sup>-1</sup>, aunque la sensibilidad ( $CE_{50}$ ) disminuye en el tiempo entre 0.03 a 0.1 mg L<sup>-1</sup> 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, con  $CE_{50} \leq 0.095$  mg L<sup>-1</sup> para poblaciones sensibles, y 0.18 - 0.39 y  $\geq 0.90$  mg L<sup>-1</sup> para tolerantes y resistentes (Cañas *et al.* 2009). Las cepas resistentes se identificaron en países donde se realiza un alto número de aplicaciones de fungicidas por ciclo como Ecuador y Costa Rica (Marín *et al.*, 2003).

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

Aislamiento	$b \pm EE^{\dagger}$	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	$CE_{95}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	$p > \chi^2$ *	PR <sub>50</sub>	PR <sub>95</sub>
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;  $\dagger$  = Error estándar de la pendiente; \* = Probabilidad de que la línea log Dosis-Probit ajuste a una línea recta.

### 2.3.3.2 Respuesta al tridemorf

Los valores de la CE50 para los aislamientos de *M. fijiensis* fluctuó entre 0.0001 mg L<sup>-1</sup> y 0.002 mg L<sup>-1</sup> y la CE95 entre 0.006 mg L<sup>-1</sup> y 2.0 mg L<sup>-1</sup>. Los aislamientos de la finca Recreo (MF-RcC3, MF-RcC4, MF-RcC5) y Alegre (MF-AlgC5) presentaron la mayor CE95. 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 CE95 entre el aislamiento sensible y el más tolerante fue superior a 28.3, y correspondió al aislamiento MF-RcC3 (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Sensibilidad al fungicida tridemorf de aislamientos de *M. fijiensis* colectadas en fincas bananeras de Tabasco y Chiapas con diferentes programas de control. Ciclo 2010-2011.**

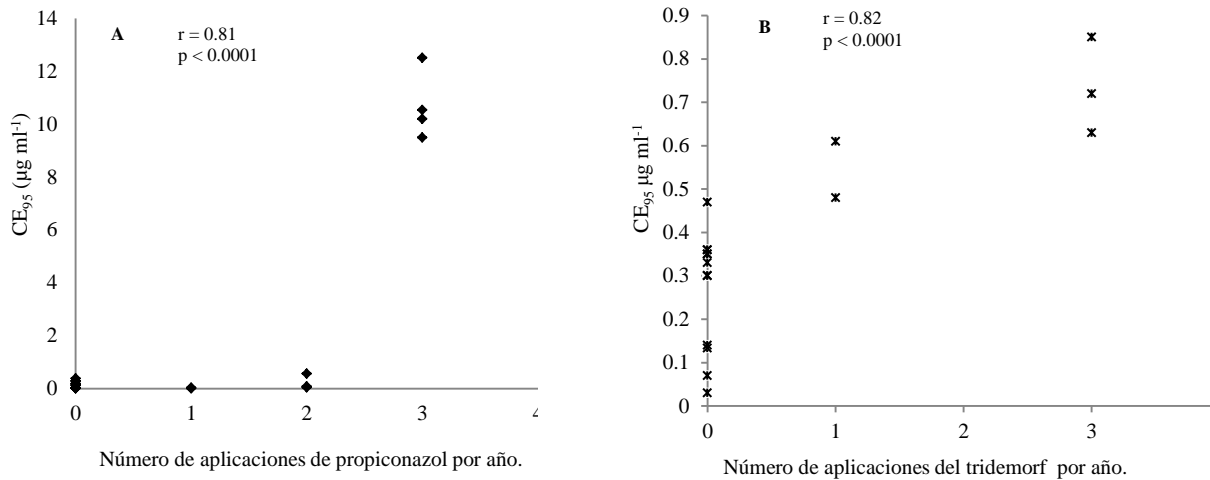
Aislamiento	b±EE <sup>¶</sup>	CE <sub>50</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )	CE <sub>95</sub> (µg ml <sup>-1</sup> )	p > χ <sup>2*</sup>	PR <sub>50</sub>	PR <sub>95</sub>
MF-EbC4	2.2 ± 0.2	0.0004 (0.0002 – 0.0006)	0.133 (0.053 – 0.46)	0.0001	4.0	4.43
MF-EbC5	1.9 ± 0.2	0.0001 (0.00007 – 0.0002)	0.301 (0.09 – 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.

### 2.3.4 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  $\alpha$ -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 de sensibilidad del hongo ( $CE_{95}$ ) y el número de aplicaciones de esta molécula realizadas para el control de *M. fijiensis* hubo una correlación positiva ( $r = 0.82$ ) (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  $\Delta 7$ - $\Delta 8$  iomerasa y la  $C_{14}$  reductasa (Kerkenaar, 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.



**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% (CE<sub>95</sub>) 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.**

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).



## 2.4 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.

## 2.5 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 Management Science* 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 Protection* 28: 41-45.
- Chin, K. M., M. Wirz, and D. Laird. 2001. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Disease* 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. *Molecular Plant Pathology* 12: 307-328.
- Cronshaw K, G., Lorenz, and D. Mappes. 1994. Monitoring results of *Mycosphaerella fijiensis* to tridemorph. *In: Fungicide Resistance*. Heany S, Slawson D, Holloman DW, Smith M, Russell PE, Parry DW ed. British Crop Protection Council Monograph No. 60. Pp. 315-321.
- Crous, P. W., U. Braun, and J. Z. Groenewald. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58: 1-32.

- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2010. Fungicide use guidelines. 10<sup>th</sup> 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. Tropical Agriculture (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. Mycological Research 97: 670-674.
- Kablan, L., Lagache, A., Delvaux, B., and Legreve, A. 2012. Silicon reduces black Sigatoka development in banana. Plant Disease 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, 1995, 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 Disease 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*. Journal of Phytopathology 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. Tropical plant pathology 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 Disease 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 Caroline.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 Management Science 56: 833-841.

- Stover, R. H. 1974. Effect of measured levels of Sigatoka disease of bananas on fruit quality and leaf senescence. *Tropical Agriculture* 51: 531-542.
- Stover, R. H. 1976. Distribution and cultural characteristic of the pathogens causing banana leaf spot. *Tropical Agriculture (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: PCR Protocols. A Guide to Method and Applications*. M.A. Inni, D. H. Gelfand, J. J. Sninski, and T.J. White, (eds). Academic Press, San Diego, CA. Pp. 315 – 322.