

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA

PROGRAMA DE POSGRADO

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*
A FUNGICIDAS INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DEL ERGOSTEROL (ISE)
UTILIZANDO ASCOSPORAS Y CONIDIOS

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

Magister Scientiae

por

Carl William Williams Bailey

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

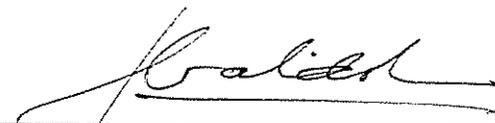
Turrialba, Costa Rica

1989

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

COMITE ASESOR:



Ph.D. José J. Galindo.
Profesor Consejero



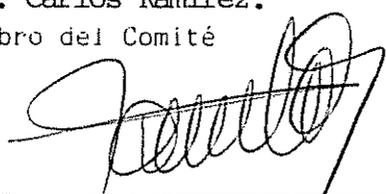
M.Sc. Phillip Shannon.
Miembro del Comité



Ph.D. Elkin Bustamante.
Miembro del Comité



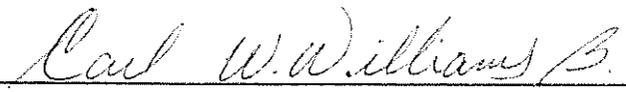
Ph.D. Carlos Ramirez.
Miembro del Comité



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado



Dr. José Luis Parisi
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



Candidato

DEDICATORIA

El esfuerzo de estos
dos años se lo
dedico a mis padres,
hermanos y a mi hija
Carolyn Danahis.

AGRADECIMIENTO

A Dios Todopoderoso por todo lo que me ha brindado en el transcurso de mi vida,

a las siguientes personas e instituciones:

a mi asesor José J. Galindo Ph.D. por sus valiosas sugerencias y comentarios,

a los miembros de mi Comité Asesor: Phillip Shannon M.Sc., Ramiro Jaramillo M.Sc., Elkin Bustamante Ph.D. y Carlos Ramírez Ph.D., por sus constantes consejos y facilitarme algunos contactos con investigadores relacionados a la materia de esta Tesis,

a Don Guillermo y Fernando del laboratorio de Fitopatología del CATIE,

a los muchachos del laboratorio de sanidad vegetal de ASBANA en Guápiles,

a Ana Tapia y Nelly Vázquez por sus importantes aportes e ideas,

al Servicio de Intercambio Académico Alemán (DAAD) por otorgarme la beca para realizar esta maestría,

al personal del proyecto MIF del CATIE, por su gran empeño y dedicación al impartir sus clases,

a mis compañeros de la promoción 1987-1989 por su amistad y estímulo,

a mi esposa Teresa por su amor, comprensión y dedicación en el transcurso de estos dos años,

a todos ellos mi más sincero agradecimiento.

BIOGRAFIA

El autor nació en la provincia de Bocas del Toro de la República de Panamá, en octubre de 1987.

Realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Panamá, donde obtuvo el título de Licenciatura en Ingeniería Agronómica Fitotecnista, en mayo de 1983.

A partir de esa fecha labora en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Panamá, como profesor asistente de investigación y docencia del Departamento de Protección Vegetal en las áreas de Fitopatología y Nematología.

En 1985 culmina sus estudios de educación en la Universidad de Panamá, recibiendo el título de Profesor de Segunda Enseñanza con especialización en ingeniería agronómica. En agosto de ese mismo año realizó un curso de cuatro meses sobre biología de la roya del café en el Centro de Investigaciones de la roya del café en Portugal.

A partir de septiembre de 1987, ingresa al programa de estudios de posgrado del CATIE, con una beca del DAAD, en donde obtuvo su título, en octubre de 1989, de Magister en Scientiae con especialización en Manejo Integrado de Plagas.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
BIOGRAFIA	v
INDICE	vi
RESUMEN GENERAL	xi
GENERAL SUMMARY	xiii
LISTA DE CUADROS	xv
LISTA DE FIGURAS	xx
INTRODUCCION GENERAL	1
1-EFECTO DE MEDIOS DE CULTIVO, TEMPERATURA E ILUMINACION SOBRE LA ESPORULACION DE <i>CERCOSPORA FIJIENSIS</i>	4
1.1-Resumen	4
1.2-Introducción	5
1.3-Revisión de Literatura	6
1.3.1-Producción de conidios de otras especies de <i>Cercospora</i>	6
1.3.2-Medios de cultivos y condiciones ambien- tales para el crecimiento y esporulación de <i>Cercospora fijiensis</i>	8
1.3.2.1-Medios de cultivo	8
1.3.2.2-Temperatura	8
1.3.2.3-Iluminación	8
1.4-Materiales y Métodos	9
1.4.1-Descripción del método	9
1.4.2-Diseño experimental y modelo matemático	10
1.5-Resultados	12
1.5.1-Esporulación de <i>Cercospora fijiensis</i> en condiciones de oscuridad	12
1.5.2-Esporulación de <i>Cercospora fijiensis</i> bajo dos condiciones de iluminación	14
1.5.3-Esporulación de <i>Cercospora fijiensis</i> en condiciones de iluminación	17
1.6-Discusión	21

1.6.1-Efecto de medios de cultivos sobre la esporulación de <i>Cercospora fijiensis</i>	21
1.6.2-Efecto de la luz sobre la esporulación de <i>Cercospora fijiensis</i>	22
1.6.3-Efecto de la temperatura sobre la esporulación de <i>Cercospora fijiensis</i>	23
1.6.4-Efecto de método de recolección de conidios	24
1.6.5-Germinación <u>in situ</u> de los conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> sobre los conidioforos.	25
1.7-Conclusiones	26
1.8- Recomendaciones	27
2-ESTABLECIMIENTO DE LINEA BASE DE SENSIBILIDAD EN <i>MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS</i> A FUNGICIDAS ISE UTILIZANDO ASCOSPORAS Y CONIDIOS	28
2.1-Resumen	28
2.2-Introducción	30
2.3-Revisión de Literatura	32
2.3.1-Resistencia de Patógenos a Fungicidas de Acción Específica	32
2.3.1.1-Definición de Resistencia a Fungicidas	32
2.3.1.2-Surgimiento de la Resistencia a Fungicidas de Acción Específica	32
2.3.1.3-Factores que Afectan el Desarrollo de la Resistencia a los Fungicidas ..	32
2.3.1.4-Mecanismos de Resistencia a los Fungicidas	33
2.3.1.5-Resistencia Cruzada y Múltiple a Fungicidas	34
2.3.2-Fungicidas Inhibidores de la síntesis del Ergosterol	34
2.3.2.1-Características de los Fungicidas Inhibidores de la Síntesis del Ergosterol	34

2.3.2.2-Clasificación de los fungicidas Inhibidores de la Síntesis del Ergosterol	34
2.3.2.3-Mecanismos de Acción de los Fungicidas Inhibidores de la Síntesis del Ergosterol	35
2.3.2.4-Resistencia a Fungicidas Inhibidores de la Síntesis del Ergosterol, en Laboratorio y Campo	36
2.3.3-Métodos Para la Detección de Resistencia a Fungicidas en <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ...	37
2.3.3.1-Métodos Utilizados Para Fungicidas Bencimidazoles	37
2.3.3.2-Métodos Utilizados Para Detectar Resistencia a Fungicidas Inhibidores de la Síntesis del Ergosterol	38
2.3.3.3-Análisis de los Datos	38
2.3.3.4-Consideraciones en que se Basa el Método Actual	39
2.4-Materiales y Métodos	40
2.4.1-Establecimiento de Línea Base de Sensibilidad con Ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	40
2.4.2-Establecimiento de Línea Base de Sensibilidad con Conidios de <i>Cercospora Fijiensis</i>	42
2.4.3-Modelo Matemático Utilizado Para Determinar la Línea Base de Sensibilidad en Ambos Métodos	43
2.5-Resultados	44
2.5.1-Con Ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .	44
2.5.1.1-Población de Guápiles	44
2.5.1.2-Población de La Lola	47
2.5.2-Con Conidios de <i>Cercospora fijiensis</i>	50

2.5.3-Comportamiento de la longitud de los tubos germinativos de las ascosporas de la población de Guápiles en función de la fecha de descarga	54
2.6-Discusión	56
2.7-Conclusiones	59
2.8-Recomendaciones	60
3-ESTUDIO DEL EFECTO DE HUMEDAD, DESECACION, SECUENCIA DE DESCARGA, HOSPEDERO, LOCALIDAD Y FUNGICIDA EN LA LONGITUD DEL TUBO GERMINATIVO DE ASCOSPORAS DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS</i>	61
3.1-Resumen	61
3.2-Introducción	63
3.3-Revisión de Literatura	64
3.3.1-Efecto de la Humedad Sobre la Descarga de Ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ..	64
3.3.2-Descarga de Ascosporas en Función de la Maduración de los Peritecios y Ascosporas ..	64
3.4-Materiales y Métodos	66
3.4.1-Muestras de Plátano y Banano de La Lola	66
3.4.2-Muestras de Banano de Guápiles y La Lola ...	67
3.5-Resultados	68
3.5.1-Para el Análisis de los Testigos	68
3.5.2-De los Datos que Incluyen el Efecto del Fungicida	82
3.6-Discusión	96
3.6.1-Efecto de la Secuencia de Descarga Sobre la Longitud del Tubo Germinativo de Ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	96
3.6.2-Efecto de la Humedad	97
3.6.3-Efecto del Hospedero	97
3.6.4-Efecto de Tipo de Desechado	97
3.6.5-Efecto del Fungicida	98
3.6.6-Efecto de la Localidad	98
3.6.7-Efecto de las Interacciones	99
3.7-conclusiones	102

3.8-Recomendaciones	102
BIBLIOGRAFIA	104
APENDICES	109

WILLIAMS B, CARL W. 1989. Determinación de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a fungicidas inhibidores de la síntesis del ergosterol (ISE) utilizando ascosporas y conidios. Tesis Mag. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. 114 p.

Palabras claves: conidios, medios de cultivo, ascosporas, peritecios, tubo germinativo, resistencia, fungicidas ISE, *Mycosphaerella fijiensis*.

RESUMEN GENERAL

Se estudió el efecto de los siguientes factores en la esporulación de *Mycosphaerella fijiensis*: i) medios de cultivo (agar papa dextrosa, agar jugo VB, agar Mycophil y agar Czapeck con extracto de levadura al 0.1%), ii) temperaturas (23, 25, 27, 29°C y temperatura ambiente que fluctuó entre 21-30°C), e iii) Iluminación (oscuridad continua y oscuridad e iluminación alternada cada 12 hr). También se estudiaron dos métodos de recolección de conidios: la tradicional (luego de 12 días se inunda el plato Petri con 10 ml de una solución de Tween 80 al 0.013% y se raspa la superficie de las colonias con un pincel y se recoge en un beaker) y raspado de la superficie de las colonias luego de 12 días, para recolectar los conidios cuatro días después.

El hongo esporuló en mayor abundancia sobre el medio agar jugo VB, que en los otros medios; igualmente se demostró que el hongo esporula a oscuridad, pero en menor cantidad comparado a condiciones de iluminación. También se encontró que la mejor condición de temperatura para la esporulación del hongo es la ambiental que fluctuó entre 21-30°C; y por último que el mejor método de recolección de conidio es el raspado de la superficie de las colonias y recolección de conidios cuatro días después.

Se estableció el nivel de sensibilidad en *M. fijiensis* a los fungicidas Propiconazole y Flusilazole, utilizando ascosporas y conidios del hongo. Se evaluaron dos localidades: i) con historial de uso de los fungicidas evaluados (Guápiles) y ii) sin historial de aplicación de fungicidas (La Lola). Las muestras obtenidas en Guápiles procedían de banano, y las que se obtuvieron de La Lola procedían de banano y plátano. Los datos obtenidos en el ensayo fueron analizados utilizando la función de Saturación, que es dada por la ecuación $Y=(A*X)/(B+X)$. Se encontró que el mejor parámetro para definir la sensibilidad del hongo, de la ecuación de Saturación es "A" que indica el máximo porcentaje de reducción obtenido sobre la longitud del tubo germinativo de las esporas del hongo.

No se encontró diferencia entre las poblaciones del hongo entre localidades ni entre los hospederos, como tampoco entre los fungicidas. Se observó que el método que utiliza

conidios presenta una variabilidad similar en sus respuestas, al método que usa ascoporas.

Se estudió el efecto que tienen la humedad (con y sin cámara húmeda por 48 hr), secuencia de descarga (cada 48 hr del mismo material), hospedero (plátano y banano), localidad (con historial y sin historial del uso del fungicida) y fungicida (cinco concentraciones de Propiconazole), sobre la longitud del tubo germinativo de las ascoporas de *M. fijiensis*.

Se encontró que el uso de la cámara húmeda promueve la maduración de las ascoporas e igualmente aumenta la longitud de sus tubos germinativos. Además se observó que después de una descarga, se necesita 96 horas aproximadamente para que las ascoporas jóvenes maduren cuando no se usa la cámara húmeda, pero cuando se usa entonces este período disminuye. También se detectó que las ascoporas jóvenes son descargadas pero, poseen tubos germinativos más cortos.

No se observó un efecto diferencial del fungicida sobre la longitud del tubo germinativo de las ascoporas de las distintas poblaciones estudiadas; aunque si se observó que el fungicida tiende a igualar las longitudes del tubo germinativo de las ascoporas a las concentraciones altas del fungicida (0,05 a 0,1 ppm), independientemente de la longitud del tubo germinativo de los testigos; mostrando un efecto de saturación en la respuesta del hongo al fungicida.

WILLIAMS W, CARL W. 1989. Determination of *Mycosphaerella fijiensis* sensibility to ergosterol biosynthesis inhibitor fungicides, using ascospores and conidia. Thesis Mag. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. 114 P.

Key Words: conidia, culture media, ascospores, perithecia, germ tube, resistance, ISE fungicides, *Mycosphaerella fijiensis*.

GENERAL SUMMARY

The effect of some growth and enviromental factors on the sporulation of *Mycosphaerella fijiensis*, were studied. These included: a) Culture Media (Potato dextrose agar, V8 juice agar, Mycophil agar and Czapeck's medium plus 0.1% Yeast extract), b) Temperatures (23, 25, 27, 29°C and Laboratory temperature which fluctated between 21 and 30°C) and c) Illumination (continuos darkness and illumination alternated with darkness every 12 hr). Also, two methods for recollection of conidia, were studied: traditional (after 12 days, the Petri dish was flooded with 10 ml of Tween 80 at 0.013%, then the surface of the colonies were scraped with a brush, and the content of the Petri dish transferred in to a beaker) and the other method involved scraping the surface of the colonies 12 days after, followed with the collection of conidia four days later.

The fungus sporulate abundantly on the V8 juice agar medium in comparison to the others utilised. Sporulation was also detected in darkness but to a smaller degree than that of illuminated conditions. Further, it was found that the best temperature conditions for sporulation of the fungus were the one that fluctuated between 21 and 30°C, and the best method for conidia collection was scraping the surface of the colonies and collecting the conidia four days later.

The sensibility level of *M. fijiensis* was established with the fungicides propiconazole and flusilazole using ascospores and conidia of the fungus. This trial was evaluated in two localities: a) one with historical use of the fungicides evaluated (Guapiles) and b) without history of the utilisation of these fungicides (La Lola). The samples obtained in Guapiles belonged to the banana cultivation and the samples obtained in La Lola originated from both banana and plantain cultivation. The data obtained in this experiment were analyzed by utilizing the saturation funtion, which was given by the ecuation $Y=(A*X)/(B+X)$. It was determined that the best parameter to define sensibility of the fungus was the "A" value which indicated the maximum percentage of reductions on the length of the germ tube of the fungus.

No difference was found in the population of the fungus between localities, hosts or fungicides. It was demonstrated that the method that used conidia presented similar variability in the response to the fungicide as the method with ascospores, under the conditions of this assay.

The effect of: moisture (without and with moisture chamber); discharge sequence (from the same material every 48 hr); host (plantain and banana); locality (without and with historical of the use of the fungicide); and fungicide (five concentrations of propiconazole), on the germ tube length of the ascospores from *M. fijiensis*, were studied.

It was encountered that the use of the moisture chamber promoted ascospores maturity resulting in an increase in the length of it's germ tube. Furthermore it was shown that after a discharge, the young ascospores required 96 hours to mature, but with the use of moisture chamber this period was shortened. Also it was observed that young ascospores were discharged but they were characterised with shorter germ tubes.

No distinctive effect of the fungicide was found on the germ tube length of the ascospores from the different population studied; although was observed that at the higher concentration of the fungicides (0.05 and 0.1 ppm) the germ tube length of the ascospores trend to be alike, independently of the germ tube length from the checks; exhibiting an effect of saturation in the response of the fungus to the fungicide.

LISTA DE TABLAS

En el Texto

Tabla N°		Página N°
1.1	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> bajo dos métodos de recolección de conidios.	13
1.2	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> en cuatro medios de cultivo.	13
1.3	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> a cuatro temperaturas.	13
1.4	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> en dos condiciones de iluminación.	16
1.5	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> bajo dos métodos de recolección de conidios.	16
1.6	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> en cuatro medios de cultivo.	16
1.7	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> a dos temperaturas.	17
1.8	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> bajo dos métodos de recolección de conidios.	19
1.9	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> en cuatro medios de cultivo.	19
1.6	Producción de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> a tres temperaturas.	19
2.1	Longitud y porcentaje de reducción de la longitud de los tubos germinativos de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> de Guápiles ante los fungicidas propiconazole y flusilazole.	45
2.2	Valores de la concentración del fungicida (B) Y del máximo porcentaje de reducción del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> (A) de Guapiles.	47
2.3	Longitud y porcentaje de reducción del tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> procedente de La Lola en banano y plátano en varias concentraciones de propiconazole.	48

2.4	Longitud y porcentaje de reducción del tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> procedente de La Lola en banano y plátano en varias concentraciones de flusilazole.	48
2.5	Valores de la concentración del fungicida (B) Y del máximo porcentaje de reducción (A) del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de La Lolo.	50
2.6	Longitud y porcentaje de reducción del tubo germinativo de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> de Guápiles bajo propiconazole y flusilazole, a las 24 horas.	51
2.7	Valores de la concentración del fungicida (B) y del máximo porcentaje de reducción del tubo germinativo de conidios de <i>C. fijiensis</i> (A), de la población de Guápiles.	52
2.8	Longitud y porcentaje de reducción de tubos germinativos de conidios de <i>Cercospora fijiensis</i> sometidas a propiconazole, a las 54 horas.	54
2.9	Longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> de testigos de Guápiles para cada fecha de descarga.	54
3.1	Efecto de la secuencia de descarga y del hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> bajo dos condiciones de humedad.	69
3.2	Efecto de secuencia de descarga y la procedencia en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> bajo dos condiciones de humedad.	71
3.3	Efecto de la secuencia de descarga y del hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .	73
3.4	Efecto de la secuencia de descarga y de la procedencia sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> .	75
3.5	Efecto de la humedad y del hospedero en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> .	76

Tabla N°		Página N°
3.6	Efecto de la humedad y de la procedencia, en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> .	78
3.7	Efecto de la secuencia de descarga y de la humedad en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> de La Lola.	79
3.8	Efecto de la secuencia de descarga y de la humedad en la longitud de tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> de Guápiles y La Lola.	81
3.9	Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> , de Guápiles y La Lola.	83
3.10	Efecto de secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole en la longitud (micras) tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> de La Lola.	85
3.11	Efecto de secuencia de descarga y concentración de propiconazole, sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de Guápiles y La Lola.	87
3.12	Efecto de secuencia de descarga y concentración de propiconazole, sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> de La Lola.	88
3.13	Efecto de humedad y concentración de propiconazole sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> de Guápiles y La Lola.	90
3.14	Efecto de humedad y concentración de propiconazole sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> de La Lola.	91
3.15	Efecto de hospedero y concentración de propiconazole sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> de La Lola.	93

Tabla N°	Página N°
3.16	94
<p>Efecto de la procedencia y concentración de propiconazole sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> de Guápiles y La Lola.</p>	
<p>En el Apéndice</p>	
<p>Capítulo 1</p>	
1A	109
<p>Composición para un litro de los medios de cultivo Mycophil, Czapeck, V8 modificado y FDA.</p>	
2A	110
<p>Análisis de varianza para los datos de esporulación de <i>Cercospora fijiensis</i> bajo oscuridad continua.</p>	
3A	110
<p>Análisis de varianza para los datos de esporulación de <i>Cercospora fijiensis</i> bajo iluminación alterna (12:12 hr).</p>	
4A	111
<p>Análisis de varianza para los datos de Es-porulación de <i>Cercospora fijiensis</i> bajo dos dos condiciones de iluminación.</p>	
<p>Capítulo 2</p>	
1A	112
<p>Longitud del tubo germinativo de las ascosporas de de <i>M. fijiensis</i>, obtenidos en Guápiles, a bajas concentraciones de flusilazole.</p>	
2A	112
<p>Valores de la concentración del fungicida (B) y del máximo porcentaje de reducción (A) del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i>, de varias fincas de en Honduras, sometidas al fungicida propiconazole.</p>	
<p>Capítulo 3</p>	
1A	113
<p>Análisis de varianza de los datos sin considerar el efecto de fungicida sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de <i>M. fijiensis</i> de La Lola, y los factores e interacciones significativas.</p>	
2A	113
<p>Análisis de varianza de los datos sin considerar el efecto de fungicida sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de <i>M. fijiensis</i> de La Lola y Guápiles y los factores e interacciones significativas.</p>	

3A	Análisis de varianza para los datos sobre la población de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> de plátano y banano de procedente de La Lola, y los factores e interacciones significativos.	114
4A	Análisis de varianza para los datos sobre la población de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> de banano de procedente de La Lola, y los factores e interacciones significativos.	114

LISTA DE FIGURAS

En el Texto

Figura N°		Página N°
2.1	Reducción de la longitud del tubo germinativo de <i>M. fijiensis</i> de Guápiles a diferentes concentraciones propiconazole.	45
2.2	Reducción de la longitud del tubo germinativo de <i>M. fijiensis</i> de Guápiles a diferentes concentraciones flusilazole.	46
2.3	Efecto de varias concentraciones de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de La Lola.	49
2.4	Efecto de varias concentraciones de flusilazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de La Lola.	49
2.5	Reducción de la longitud del tubo germinativo de conidios de <i>C. fijiensis</i> usando varias concentraciones de propiconazole y flusilazole en la población procedente de Guápiles.	53
2.6	Longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de descargas realizadas en varias fechas, procedentes de la misma muestra tomada en Guápiles.	55
3.1	Efecto de la secuencia de descarga y hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> sin el uso de cámara húmeda.	69
3.2	Efecto de la secuencia de descarga y hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> con el uso de cámara húmeda.	70
3.3	Efecto de la secuencia de descarga y la procedencia sobre la longitud del tubo germinativo de <i>M. fijiensis</i> sin el uso de cámara húmeda.	72
3.4	Efecto de la secuencia de descarga y la procedencia sobre la longitud del tubo germinativo de <i>M. fijiensis</i> con el uso de cámara húmeda.	72

3.5	Efecto de la secuencia de descarga y hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> .	74
3.6	Efecto de la secuencia de descarga y de la procedencia sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> .	75
3.7	Efecto de la humedad y del hospedero en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> .	77
3.8	Efecto de la humedad y de la localidad en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> .	78
3.9	Efecto de la secuencia de descarga y de la humedad en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> procedentes de La Lola.	80
3.10	Efecto de la secuencia de descarga y de la humedad en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> procedente de Guápiles y La Lola.	81
3.11	Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , sin el uso de cámara húmeda.	83
3.12	Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , con el uso de cámara húmeda.	84
3.13	Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , sin el uso de cámara húmeda.	85
3.14	Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , con el uso de cámara húmeda.	86

Figura N°		Página N°
3.15	Efecto de la secuencia de descarga y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de Guápiles y La Lola.	87
3.16	Efecto de la secuencia de descarga y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de La Lola.	89
3.17	Efecto de la humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de Guápiles y La Lola.	91
3.18	Efecto de la humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de La Lola.	92
3.19	Efecto del hospedero y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de La Lola.	93
3.20	Efecto de la procedencia y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , de Guápiles y La Lola.	95

INTRODUCCION GENERAL

La sigatoka negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* (Meredith y Lawrence 1969, Mulder y Stover 1976), ataca el banano, plátano y otras musáceas (Meredith y Lawrence 1970). Esta enfermedad se manifiesta en el banano y plátano, produciendo primero unos puntos de color chocolate rojizo de aproximadamente 20 mm de largo y 2 mm de ancho con su eje más largo paralelo a la venación de la hoja; eventualmente se tornan chocolate oscuro y se hacen evidentes en el haz de la hoja, luego se transforman en manchas elípticas con borde chocolate claro y acuoso para posteriormente manifestarse en una mancha chocolate oscura a negra con centro hundido, por último el centro de la mancha se seca tornándose gris y se produce un borde chocolate oscuro a negro alrededor de la mancha (Meredith y Lawrence 1969); lo cual conduce a una necrosis severa y rápida del área foliar que causa una reducción drástica en el tamaño y calidad de los racimos (Stover 1980, 1983, Stover y Simmonds 1987). Debido a que no existen cultivares comerciales resistentes, solo ha podido ser controlada eficientemente mediante fungicidas.

Se han utilizado fungicidas protectores y sistémicos, estos últimos corresponden principalmente a los benzimidazoles y recientemente los inhibidores de la síntesis del ergosterol (ISE), (Stover 1980, Stover y Simmonds 1987, Shillingford 1984, Bureau y Ganry 1987, Foure 1988).

La mayoría de los fungicidas sistémicos (Benzimidazoles e ISE) presentan características que los hacen muy propensos a crear resistencia en los patógenos que controlan (Köller et al 1987). Estas características son consideradas de alto riesgo, cuando se hace uso indiscriminado de los fungicidas, por la formación de resistencia en los patógenos hacia estos fungicidas. Por este motivo se deben usar con precaución en el manejo de las enfermedades que controlan.

Actualmente se desconoce el peligro del desarrollo de resistencia hacia los fungicidas ISE, que se utilizan para el control de *M. fijiensis*. Los precedentes que se tienen con los bencimidazoles hacen que se tomen en consideración algunas prácticas de manejo tendientes a reducir el riesgo del desarrollo de resistencia en este hongo a los fungicidas ISE que se utilizan actualmente para su control.

Algunas recomendaciones que se siguen son: rotar las aplicaciones de los fungicidas sistémicos con otros de menor riesgo hacia el desarrollo de resistencia como los fungicidas de sitios múltiple de acción; mezclar ambos tipos de fungicidas o mezclar y/o intercalar fungicidas con diferentes mecanismos de acción (Shillingford 1984, Stover y Simmonds 1987).

Aunadas a estas prácticas, de manejo de la resistencia, esta la detección temprana de la resistencia a través del monitoreo de las poblaciones del hongo sometidas a estos fungicidas, para detectar cambios en su respuesta a determinadas concentraciones de los fungicidas utilizados (Shillingford 1984, Fungicide Resistance Action Committee - FRAC, 1988).

Se deben considerar todas las medidas tendientes a mantener la efectividad de los fungicidas disponibles para el control de la sigatoka negra, porque en la medida que el hongo presente resistencia hacia ellos, irá disminuyendo la disponibilidad de fungicidas efectivos y la reposición en el mercado de nuevos fungicidas no es rápida (Dekker 1985).

Una de las medidas que contribuirá a resolver en parte este problema es la detección temprana de la aparición de resistencia en el patógeno hacia los fungicidas sistémicos, para disponer de métodos seguros y fáciles de implementar, los cuales constituyen un pilar importante en la estrategia tendiente a conservar por más tiempo la efectividad de los fungicidas usados (Dekker 1985).

Se cuenta en la actualidad con un método para la detección de resistencia en *M. fijiensis* a fungicidas ISE

(FRAC 1988), pero como este método al igual que los fungicidas ISE son de uso reciente, no es del todo preciso, porque arroja resultados muy variables de acuerdo a las circunstancias en que se usa y tampoco se cuenta con una metodología adecuada para el análisis de la información (Molina y Salas 1989, Romero y Marín 1989), por esta razón se necesita probar otros métodos y/o mejorar el actual así como también establecer líneas de sensibilidad en las distintas poblaciones de *M. fijiensis* a los distintos fungicidas ISE, utilizados en su control, de esta manera tener alguna referencia de los índices iniciales de sensibilidad en el patógeno hacia estos fungicidas.

Todos los comentarios anteriormente expuesto han contribuido a la realización del presente estudio, que tiene por objetivos:

- 1- Establecer una metodología para la esporulación abundante de *Cercospora fijiensis*.
- 2- Establecer líneas bases de sensibilidad en *Mycosphaerella fijiensis* a fungicidas ISE, utilizando dos métodos de monitoreo.
- 3- Estudiar el efecto de la humedad , la secuencia de descarga y diferentes concentraciones del fungicida en la descarga y longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* de varias localidades y hospederos.

1- Efecto de medios de cultivo, temperatura e iluminación sobre la esporulación de *Cercospora fijiensis*.

1.1- RESUMEN

Se estudió el efecto en la esporulación del hongo de:
1-medios de cultivo (agar papa dextrosa , agar jugo V8, agar Mycophil y agar Czapeck con extracto de levadura al 0,1%),
2-temperaturas (23, 25, 27, 29°C y temperatura de laboratorio que fluctúa entre 21 y 30°C), e
3-Iluminación (oscuridad continua y oscuridad e iluminación alternada cada 12 horas).

También se estudiaron dos métodos de recolección de conidios: la tradicional (luego de 12 días se inunda el plato Petri con 10 ml de una solución de Tween 80 al 0,013% y se raspa la superficie de las colonias con un pincel y se recoge en un beaker) y raspado de la superficie de las colonias luego de 12 días, para recolectar los conidios cuatro días después.

Los resultados obtenidos indican que el hongo esporula más abundantemente sobre el medio agar jugo V8, que en los otros medios; igualmente se demostró que el hongo esporula en la oscuridad, pero en cantidad mínima comparado a condiciones de iluminación. También se encontró que la mejor condición de temperatura para la esporulación del hongo es aquella que fluctúa entre 21 y 30°C; y por último que el mejor método de recolección es el raspado de la superficie de las colonias y recolección de conidios cuatro días después.

Se encontró además que las colonias en el medio agar Mycophil no siempre se recuperaban luego del raspado y que el medio agar Czapeck con extracto de levadura era muy propenso a la contaminación.

1.2- Introducción

El obtener una esporulación abundante "in vitro" de especies del género *Cercospora* ha sido una tarea difícil (Tuite 1963).

En *Cercospora fijiensis* se ha observado esta dificultad; se considera que no se ha realizado los estudios necesarios para determinar los factores que inciden en la esporulación de *C. fijiensis*.

Se obtiene esporulación en *C.fijiensis* (Stover 1976, Fullerton 1984, Mourichon et al. 1987), pero la información que estos investigadores han dado es superficial y no indican ningún número que establezca lo que sería una esporulación abundante o mínima.

Algunas investigaciones sobre el hongo exige el uso de material homogéneo, cualidad que no es típico de las ascosporas del hongo (Stover 1971), siendo el mejor material en este caso los conidios. Pero la obtención de estos en forma abundante no está garantizado por ningún método en la actualidad.

El presente ensayo tiene como objetivos:

- 1- Estudiar el efecto de cuatro diferentes medios de cultivo, dos condiciones de iluminación, cinco temperaturas y dos métodos de recolección de conidios en la esporulación de *C. fijiensis*.
- 2- Determinar la interacción que produce la máxima esporulación de *C. fijiensis*.

1.3- Revisión de Literatura.

1.3.1- Producción de conidios de otras especies de *Cercospora*.

Murakishi *et al.* (1960), estudiaron sobre la esporulación de *Cercospora apii* el efecto de medios que contenían extracto de hojas de zanahoria en agar al igual que sobre discos de zanahoria, agar jugo VB y agar papa dextrosa (PDA) entre otros, sometidas a 20-24°C durante nueve días, los resultados obtenidos fueron que la mejor esporulación se obtuvo sobre los dos primeros medios, pero el agar jugo VB fue superior que el PDA para provocar la esporulación.

Berger y Hanson (1963), realizaron un ensayo exhaustivo sobre la esporulación de *Cercospora zebrina*, en la que evaluaron el efecto de la luz, temperatura, y medio de cultivo. Encontraron que la mejor temperatura (entre 16, 24 y 30°C), para la esporulación del hongo sobre agar jugo VB fue de 24°C y en el caso de PDA la esporulación fue pobre y no hubo evidencia de un efecto de temperatura. Determinaron que el efecto de la luz es considerable sobre la esporulación del hongo, porque aunque el hongo esporulaba en la oscuridad, era muy inferior. De 11 medios de cultivos estudiados, el agar jugo VB fue la mejor para la esporulación y de entre los medios PDA Y Czapeck, la mejor fue PDA.

Smith (1971), encontró que la mejor producción de conidios de *C. arachidicola* se obtenía bajo iluminación continua durante 14 días a 28°C.

Calpouzos (1965), obtuvo mayor esporulación en *C. beticola* bajo iluminación alternada (12:12 hr) comparado con iluminación constante, e igualmente encontró que bajo iluminación continua la esporulación siempre fue mayor para temperaturas de 15 y 22,5°C que para 30°C. Luego Calpouzos y

Stalknecht (1967), trabajando con el mismo hongo obtuvieron mayor esporulación bajo iluminación continua.

Ruppel (1971), obtuvo buena esporulación en *C. beticola* sobre extracto de hoja de remolacha a 15°C durante siete días en iluminación continua.

Asmus y Dhingra (1983), obtuvieron buena esporulación de *C. vanderysti* sobre PDA y agar extracto de hoja de zanahoria sometidas a temperatura ambiente (16-23°C), iluminación alternada (12:12 hr) durante 7 a 14 días.

Silva *et al.* (1988), trabajando con los hongos *C. caribaea* y *C. heningsii*, encontraron que la mejor esporulación del primero se obtiene sobre el medio extracto de hoja de yuca + biotina + extracto de malta a los ocho días; en cuanto al segundo patógeno se obtuvo sobre el medio extracto de hoja de yuca + extracto de malta a los siete días. Ambas situaciones se dieron a los 22°C y no mencionan condiciones de iluminación.

Canova, citado por Dhingra y Sinclair (1985) obtuvo una abundante esporulación de *C. beticola* sobre el medio PDA a 25°C y a 100% de humedad relativa luego de 48 hr, después de raspar la superficie de cultivos del hongo de siete días de edad.

Ludwig *et al.* citados por Dhingra y Sinclair (1985), lograron una abundante esporulación de *Alternaria solani* luego de mantener una corriente de agua por 24 hr sobre el medio en que crecía el hongo y después secarlo por 48 hr a condiciones de laboratorio.

Leonard y Stanley (1973) lograron la esporulación de *Schizophyllum commune* luego de infringirle daños mecánicos y dedujeron que la esporulación era promovida por la liberación de alguna sustancia de las heridas del hongo. Dahlberg y Van

Etten (1982), en una revisión sobre fisiología y bioquímica de la esporulación en hongos también señalan este hecho.

1.3.2- Medios de cultivos y condiciones ambientales para el crecimiento y esporulación de *Cercospora fijiensis*

1.3.2.1- Medios de Cultivos

Meredith y Lawrence (1969), Fullerton y Tracey (1984), y también Foure *et al.* (1988), informan que obtuvieron producción de conidios de *C. fijiensis* utilizando FDA.

Mourichon *et al.* (1987), indican que obtuvieron abundante esporulación de *C. fijiensis* usando agar jugo V8 modificado.

Por otra parte, Stover (1976), informa de la producción de conidios de *C. fijiensis* utilizando agar Mycophil.

1.3.2.2-Temperatura

Stover (1976), informa de la producción de conidios de *C. fijiensis* a temperatura de laboratorio luego de 10 a 14 días, por otra parte, Mourichon *et al.* (1987), informan que obtuvieron buena esporulación del hongo a 25°C a los diez días.

1.3.2.3- Iluminación

Fullerton y Tracey (1984) y Stover (1976), informan que obtuvieron abundante esporulación de *C. fijiensis* bajo condiciones de iluminación del laboratorio; Mourichon *et al.* (1987) y Foure *et al.* (1988), informaron de resultados similares bajo iluminación continua.

Ninguna de estas referencias, sobre *C. fijiensis*, informa de resultados cuantitativos en lo concerniente a producción de conidios, en cada método descrito.

1.4- Materiales Métodos

1.4.1- Descripción del método

Se procedió a probar cuatro medios de cultivos, bajo dos condiciones de iluminación y cinco temperaturas usando dos métodos, y cuatro réplicas.

Los medios de cultivos usados fueron: agar Mycophil (Mycophil), agar Czapeck + extracto de levadura al 0,1% (Czapeck), agar papa dextrosa (FDA), y agar jugo VB (VB) modificado (según Mourichon *et al.* 1987), (Apéndice 1A).

Las condiciones de iluminación fueron: oscuridad total y oscuridad alternada con luz cada 12 horas.

Las temperaturas usadas fueron 23, 25, 27, 29°C y condiciones de laboratorio de fitopatología del CATIE en Turrialba, de 21 a 30°C (Lab).

Los métodos de recolección de conidios usados fueron: i) la tradicional (12 días) que consiste en crecer el hongo en los medios de cultivos antes mencionado bajo las diferentes condiciones de temperatura e iluminación por espacio 12 días y luego contar la producción de conidios; ii) el otro método (12 + 4 días) involucra todo lo del primer método con la variante siguiente: luego de los 12 días se procedía a raspar la superficie del cultivo, previamente inundado, asépticamente, con 10 ml de solución (estéril) Tween 80 en agua a la concentración de 0,0133% con un pincel estéril, luego se eliminaba el agua (solución de Tween 80) y se procedía a colocar nuevamente los medios con los cultivos bajo las condiciones antes mencionados durante cuatro días; para posteriormente proceder a su conteo.

Los factores principales que fueron introducidos en el segundo método fueron: el cubrir la superficie de la colonia del hongo con la solución de Tween 80 y el raspado de esa

superficie. Esto no había sido reportado en experimentos anteriores con *C. fijiensis*.

Los platos Petri utilizados fueron de plástico con dimensiones de 9 cm x 1 cm y fueron vertidos 20 ml de medio en cada uno. Se utilizó un inóculo de 4400 propágulos (conidios y micelio) por plato, después del cual se sellaban con Parafilm "M" (American Can Company, Greenwich).

Como solo se disponía de dos incubadoras que controlaban iluminación y temperatura, se regularon para 25 y 27°C de tal forma que se podían incluir los cuatro medios de cultivo y someterlas a las dos condiciones de iluminación, el efecto de oscuridad total se lograba envolviendo los platos en papel aluminio. Las otra dos incubadoras que estaban reguladas a 23 y 29°C solo controlaban temperaturas pero no iluminación, así que en ellas se colocaron los cuatro medios de cultivos envueltas en papel aluminio. Bajo condiciones de laboratorio solo se colocaron los platos bajo iluminación natural (aprox 12 hr de luz y oscuridad diaria), no fueron colocadas a oscuridad continua.

1.4.2- Diseño experimental y modelo matemático

El modelo para este ensayo fue la siguiente: $Y_{ijk} = \mu + M_i + C_j + M_i * C_j + T_k + M_i * T_k + C_j * T_k + e_{ijk}$. Lo que representa un diseño completamente al azar en un arreglo factorial, donde Y_{ijk} representa la producción de conidios de *C. fijiensis* bajo los efectos a probar, μ representa la media general, M_i representa el efecto de método, C_j representa el efecto de los medios de cultivos, T_k el efecto de las temperaturas, e_{ijk} el error del modelo debido a cada efecto; los otros corresponden a las interacciones de primer orden entre los efectos. Este modelo fue utilizado para analizar separadamente, los dos niveles de iluminación por las razones anteriormente expuestas

Para analizar los datos, que corresponden al conteo medio de conidios de *C. fijiensis* en hematocímetro por tratamiento, se utilizó una transformación de: raíz cuadrado. Para volver a transformar los datos a valores reales se utilizó el procedimiento de añadirle el Cuadrado Medio del Error (CME), sin transformar, a los datos (Steel y Torrie 1985). Como estos valores están dadas en unidades de conteo en hematocímetro y el volumen del hematocímetro es de 0,005 ml, se deben multiplicar por 3.000 (dado el volumen total de la suspensión de tween 80 y conidios era de 15 ml), para obtener la cantidad de conidios por plato Petri. Las medias que hacen alusión a la máxima esporulación fueron obtenidos para una interacción específica de un nivel del factor involucrado y esta media está compuesta por el conteo de cuatro platos (que es el número de réplicas); igualmente el número de medias involucrados en cada valor de los factores descritos, corresponden a los productos de los números de niveles de los otros factores estudiados.

1.5- Resultados

1.5.1- Esporulaci3n de *Cercaspora fijiensis* en condiciones de oscuridad

Los resultados obtenidos en este ensayo, para la esporulaci3n de *C. fijiensis* utilizando los dos m3todos de recolecci3n de conidios se presentan en la Tabla 1.1, donde se muestra que el mejor m3todo fue el raspado de la superficie de las colonias.

Los resultados obtenidos, en cuanto a los cuatro medios de cultivo, para la esporulaci3n de *C. fijiensis* se presenta en la Tabla 1.2, donde se observa que el mejor medio fue el agar jugo V8 modificado. A pesar de que el medio FDA tuvo una mayor esporulaci3n media que Mycophil, este 3ltimo tuvo una esporulaci3n m3xima superior para un nivel dado de temperatura, coincidiendo con el an3lisis de varianza para estos datos (Ap3ndice 2A) que indica una interacci3n significativa entre medios de cultivo y temperatura.

Los resultados obtenidos, en cuanto a las cuatro temperaturas, para la esporulaci3n de *C. fijiensis* se presentan en la Tabla 1.3, donde se observa que la mejor temperatura fue de 23°C. Es interesante anotar que la m3xima esporulaci3n obtenida, no fue a la temperatura que present3 la media mayor, indicando una interacci3n de medios de cultivo y temperatura como lo seala el an3lisis de varianza para estos datos en el ap3ndice 2A.

TABLA 1.1 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* bajo dos métodos de recolección de conidios.

Método	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
12+4 días	12	1,716A ⁴	9.330	43.500
12 días	12	0,983B	3.390	24.750

TABLA 1.2 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* en cuatro medios de cultivo.

Medio de cultivo	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
V8	8	2,142A ⁴	14.250	43.500
PDA	8	1,197B	4.800	14.250
Mycophil	8	1,082B	4.020	21.000
Czapeck	8	0,978B	3.360	10.500

TABLA 1.3 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* a cuatro temperaturas.

Temperatura °C	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
23	8	1,747A ⁴	9.660	21.000
25	8	1,554B	7.740	43.500
27	8	1,294B	5.520	10.500
29	8	0,803B	2.430	3.750

¹ Para los datos transformados

² Corresponde a la cantidad verdadera de conidios por plato

³ Máx. número de conidios por plato a ese nivel del factor, esta media corresponde a cuatro réplicas.

⁴ Medias con diferentes letras difieren significativamente al 0,05% según la prueba de Tukey.

⁵ Número de medias involucrados para ese factor y cada media esta compuesta de cuatro réplicas.

1.5.2- Esporulaci3n de *Cercospora fijiensis* bajo dos condiciones de iluminaci3n.

Se analizaron los resultados obtenidos bajo las dos condiciones de iluminaci3n (iluminaci3n y oscuridad alterna cada 12 horas, y oscuridad continua) conjuntamente, para las temperaturas 25 y 27°C.

El resultado para ambas condiciones de iluminaci3n se presenta en la Tabla 1.4, en donde se muestra que la mayor producci3n media de conidios de *C. fijiensis* se obtiene utilizando la iluminaci3n alternada con oscuridad, aunque la diferencia entre ambas situaciones, no afecta significativamente la producci3n de conidios, para ese rango de temperaturas. En las tablas anteriormente presentadas tampoco se encontr3 diferencia entre temperaturas en ninguna de las situaciones estudiadas aisladamente. Aunque la mayor producci3n media de conidios se obtuvo bajo iluminaci3n, hubo una m3xima esporulaci3n bajo condiciones de oscuridad, a un nivel dado de ese factor lo que indica una interacci3n entre iluminaci3n y otro factor. Esta interacci3n no fue encontrada en el an3lisis de varianza para estos datos (Ap3ndice 4A) a nivel de las interacciones de primer orden.

El resultado de esta parte del ensayo sobre la esporulaci3n de *C. fijiensis*, utilizando ambos m3todos de recolecci3n de conidios se presenta en la Tabla 1.5, donde se ve que el mejor m3todo es el raspado de la superficie de la colonia del hongo en crecimiento y recolecci3n de los conidios cuatro d3as despu3s, independientemente del tipo de iluminaci3n y temperatura.

El resultado sobre los cuatro medios de cultivo en la esporulaci3n de *C. fijiensis*, se presenta en la Tabla 1.6, donde se ve que el mejor medio para la producci3n de conidios es el agar jugo V8. Este resultado se mantiene

independientemente de las temperaturas y condiciones de iluminación o método estudiado.

El resultado para la esporulación del hongo, bajo estudio, en función de las dos temperaturas se presenta en la Tabla 1.7, en la misma se ve que la mayor esporulación se obtuvo a los 25°C, aunque la cantidad de conidios obtenidos no difiere significativamente a una u otra temperatura.

TABLA 1.4 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* en dos condiciones de iluminación.

Iluminación	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
luz alterna	16	1,523A ⁴	7.849	41.250
oscuridad	16	1,424A	6.973	43.500

TABLA 1.5 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* bajo dos métodos de recolección de conidios.

Método	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
12+4 días	16	1,930A ⁴	12.065	43.500
12 días	16	1,016B	3.987	24.750

TABLA 1.6 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* en cuatro medios de cultivo.

Cultivo	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
VB	8	2,652A ⁴	21.989	43.500
FDA	8	1,226B	5.399	15.750
Mycophil	8	1,223B	5.377	12.750
Czapeck	8	0,792B	2.772	6.000

¹ Para los datos transformados

² Corresponde a la cantidad verdadera de conidios por plato

³ Máx. número de conidios por plato a ese nivel del factor, esta media corresponde a cuatro réplicas.

⁴ Medias con diferentes letras difieren significativamente al 0,05% según la prueba de Tukey.

⁵ Número de medias involucrados para ese factor y cada media esta compuesta de cuatro réplicas.

TABLA 1.7 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* a dos temperaturas.

Temperatura	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
25		1.582A ⁴	8.398	43.500
27		1.365A	6.480	41.250

1.5.3- Esporulación de *Cercospora fijiensis* en condiciones de iluminación

Los resultados obtenidos para la esporulación de *C. fijiensis*, en función de los dos métodos de recolección de conidios se muestran en la Tabla 1.8, donde se observa que el mejor método fue el raspado de la superficie de la colonia y recolecta de conidios cuatro días después.

Los resultados obtenidos para la esporulación de *C. fijiensis*, sobre los cuatro medios de cultivo, se presenta en la Tabla 1.9, donde se observa que la mayor esporulación se produjo en el agar jugo V8.

En cuanto al resultado obtenido para la esporulación de *C. fijiensis*, en función de las tres temperaturas estudiadas, se presenta en la Tabla 1.10, donde se muestra que la mejor temperatura fue la de condiciones de laboratorio. También indica una interacción significativa entre medios de cultivo y otros factores (temperatura y métodos de recolección de conidios según el Apéndice 3A) porque el medio Czapeck tuvo una esporulación máxima, superior al de Mycophil.

¹ Para los datos transformados

² Corresponde a la cantidad verdadera de conidios por plato

³ Máx. número de conidios por plato a ese nivel del factor, esta media corresponde a cuatro réplicas.

⁴ Medias con diferentes letras difieren significativamente al 0,05% según la prueba de Tukey.

⁵ Número de medias involucrados para ese factor y cada media esta compuesta de cuatro réplicas.

El análisis de varianza para estos datos (Apéndice 3A) indica que hay una interacción significativa entre métodos de recolección y temperatura, al igual que para medios de cultivo y temperatura, esto se demuestra en el hecho de que a pesar de una mayor esporulación media a 25°C, la máxima esporulación se obtuvo a 27°C.

TABLA 1.8 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* bajo dos métodos de recolección de conidios.

Método	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
12+4 días	12	3,652A ⁴	42.690	346.200
12 días	12	1,730B	11.640	165.000

TABLA 1.9 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* en cuatro medios de cultivo.

Cultivo	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
VB	6	4,00A ⁴	50.670	346.200
PDA	6	2,647B	23.700	174.500
Mycophil	6	1,785B	12.240	30.500
Czapeck	6	1,616B	10.500	49.500

TABLA 1.10 Producción de conidios de *Cercospora fijiensis* a las tres temperaturas.

Temperatura	Conidios			
	Num ⁵	Media ¹	Media real ²	Esporulación max. ³
Lab (21-30)	8	4,546A ⁴	64.680	346.200
25	8	1,610B	10.440	27.750
27	8	1,436B	8.850	41.250

¹ Para los datos transformados

² Corresponde a la cantidad verdadera de conidios por plato

³ Máx. número de conidios por plato a ese nivel del factor, esta media corresponde a cuatro réplicas.

⁴ Medias con diferentes letras difieren significativamente al 0,05% según la prueba de Tukey.

⁵ Número de medias involucrados para ese factor y cada media esta compuesta de cuatro réplicas.

Un fenómeno que se observó en este ensayo, fue la de un tipo de germinación "in situ" de los conidios sobre el conidioforo .

Otros hechos observados fueron que el medio Mycophil, generalmente, no se recuperaba luego del raspado como los otros medios. También el medio Czapeck se contaminaba con mayor frecuencia que los otro medios.

1.6- Discusión

1.6.1- Efecto de medios de cultivos sobre la esporulación de *Cercospora fijiensis*.

El hecho de que *C. fijiensis* tenga un desarrollo y esporulación vigorosa bajo condiciones de nutrición adecuada, demuestra que la esporulación no es motivada por una reducción del nivel nutritivo del medio, o que compitan la fase de crecimiento vegetativo con la de esporulación. La ley de Klebs sostiene que la esporulación es favorecida por condiciones nutricionales que restringen el crecimiento vegetativo (Cochrane 1958), esto no concuerda completamente con los resultados de este ensayo.

Las diferencias en esporulación de *C. fijiensis* demuestra la existencia de un factor(es) nutricional que promueve o inhibe la esporulación.

Los cuatro medios de cultivo probados, favorecen el crecimiento y desarrollo de *C. fijiensis*, permitiendo su esporulación. El agar jugo V8 es superior para la esporulación que los otros medios, talvez, debido a su alto contenido de elementos nutritivos naturales comparado con las sustancias sintéticas de los otros medios.

En pruebas preliminares, se probó un medio con extracto de hoja de banano - tiamina - glucosa y agar sobre el que creció el hongo, pero con una esporulación pobre. Este medio a pesar de contener sustancias nutritivas naturales no produjo abundante esporulación y un elemento nutritivo sintético que contenía era la glucosa, azúcar esta que no tenía el medio agar jugo V8, por lo que se puede considerar que la glucosa tiene algún efecto detrimental o inhibitorio de la esporulación del hongo. Esta respuesta obtenida con la glucosa concuerda con el obtenido por Berger y Hanson (1963), en un trabajo similar hecho sobre *C. zebrina* encontraron que

utilizando un extracto de *Trifolium pratense* + 2% glucosa y agar la esporulación era mínima comparado a ese medio sin la glucosa.

Los resultados obtenidos por Berger y Hanson (1963) sobre los medios de cultivo agar jugo V8, PDA, y agar Czapeck, al igual que los obtenidos por Murakishi *et al.* (1960) sobre los medios de cultivo agar jugo V8 y PDA, en la producción de conidios de especies de *Cercospora* son coincidentes con los de este ensayo.

Es posible que los medios Mycophil y Czapeck agar no propiciaron una buena esporulación de *C. fijiensis*; dado la poca recuperación de la colonia del hongo sobre agar Mycophil luego del raspado y/o inundación del medio en crecimiento, al igual que el efecto de la contaminación del agar Czapek lo cual fue propiciado por la riqueza del medio (extracto de levadura) que promueve el crecimiento bacteriano.

1.6.2- Efecto de luz sobre la esporulación de *Cercospora fijiensis*

C. fijiensis esporula sobre su hospedero bajo condiciones de oscuridad continua, cuando se coloca en cámara húmeda dentro de una incubadora oscura. Pero no se ha señalado una comparación cuantitativa de la esporulación, sobre hospedero, bajo diferentes condiciones de iluminación. Esto hubiera servido para determinar si el efecto de iluminación interactúa con algún nutriente, que bajo condiciones "in vitro" no es suministrado al hongo.

Bajo condiciones de oscuridad la esporulación "in vitro", de *C. fijiensis*, es menor comparada en condiciones de iluminación. Por lo que hace pensar en la existencia de un mecanismo fotosensitivo en la esporulación del hongo. Esto, se confirma con los resultados obtenidos por Foure *et al* (1988) y Mourichon (1987), que utilizaron iluminación

continúa al igual que para los resultados obtenidos por Fullerton y Tracey (1984) y Stover (1976), quienes trabajaron con la iluminación del laboratorio en la esporulación del hongo.

Se obtuvieron resultados similares en cuanto al efecto de la luz para la esporulación de otras especies de *Cercospora*. Calpouzos (1965) obtuvo mayor esporulación de *C. beticola* utilizando luz alterna con oscuridad (12:12 hr) que bajo luz constante. Eventualmente, Calpouzos y Stallknech (1967), Rupel (1971), obtuvieron la mayor esporulación del mismo hongo bajo iluminación continua que a oscuridad continua. Iguales resultados obtuvieron Berger y Hanson (1963), sobre *C. zebrina*. Todos estos resultados son coincidentes con los de este ensayo para *C. fijiensis*.

1.6.3- Efecto de la temperatura sobre la esporulación de *Cercospora fijiensis*.

El efecto de temperatura parece que no es, significativamente, crítico bajo condiciones de oscuridad continua y a un rango de temperatura cercano al óptimo para el desarrollo de *C. fijiensis* (23-29°). Esto es debido a que tal vez la iluminación ejerce un mayor efecto sobre la esporulación que la temperatura en ese rango, cercano al óptimo, o que es mayor el efecto de una temperatura fluctuante que una constante. De estas dos suposiciones es más aceptable la segunda en vista de los resultados obtenidos al analizar los datos conjuntos de esporulación a las dos temperaturas, bajo oscuridad total e iluminación alternada. Esto lo demuestra el hecho de que bajo temperatura de laboratorio la esporulación fue mayor que para los otros niveles de temperatura.

Lamentablemente no se incluyó un tratamiento de oscuridad continua bajo condiciones de laboratorio con lo que

se hubiese evaluado el efecto de la iluminación bajo esas condiciones de temperatura.

El trabajo de Berger y Hanson (1963) señala que la mejor temperatura para crecimiento vegetativo, es igual para la esporulación de *C.zebrina*. En el caso de *C.fijiensis*, no se conoce si hay una temperatura adecuada para su desarrollo vegetativo, que sea diferente al que promueva una máxima esporulación, pero si esto fuera cierto el mejor nivel de temperatura del ensayo sería aquella dada por las condiciones de laboratorio, que para efecto de este ensayo coincide con la temperatura que promovió la mayor esporulación.

1.6.4- Efecto de método de recolección de conidios.

Talvez se podría pensar que los resultados obtenidos por el método de recolección de conidios, que se realiza cuatro días después del raspado de la superficie de la colonia, se deban a que este promueve un mayor número de inóculo por plato y por ende una mayor superficie esporulante. Talvez sea así, pero las observaciones hechas a estos platos al momento del conteo indicaban que los sectores donde más esporulaba el hongo, era en aquellas colonias viejas y que eran escasas las colonias nuevas (cuatro días) que esporulaban y cuando lo hacían, era pobre.

El efecto de raspado podría ocasionar un daño mecánico, con lo que se promueve la esporulación del hongo tal vez liberándose alguna sustancia que estimula su esporulación, como lo señalan Leonard y Stanley (1973), sobre el hongo *Schizophyllum commune*, al igual que Dahlberg y Van Etten (1982). Tambien Canova (citado por Dhingra y Sinclair 1985), obtuvo resultado similar a los de este trabajo con *C. beticola* utilizando un procedimiento similar.

En cuanto el efecto de la inundación de las colonias no considero que haya sido un factor definitivo en este método

ya que fue por un período muy corto, aunque para el trabajo de Ludwig *et al.* (citados por Dhingra y Sinclair 1985), si fue un factor definitivo en la esporulación de *Alternaria solani*.

1.6.5- Germinación *in situ* de los conidios de *Cercospora fijiensis* sobre los conidioforos.

Este fenómeno también lo observó Berger y Hanson (1963) sobre *C zebrina*, y probablemente sea la causa de un bajo conteo de conidios ya que cuando se produce esto, se confunden los conidios y conidioforos. Tal vez, este factor, pueda controlarse realizando la cosecha de los conidios más temprano, impidiendo así que los conidios germinen sobre los conidioforos.

1.7- Conclusiones

Se puede hacer varias conclusiones con respecto de los resultados de este ensayo:

- 1- La mayor esporulación del hongo se obtuvo sobre el medio agar jugo V8, bajo todas las condiciones de temperatura, iluminación y metodo usados en el ensayo.
- 2- La mayor esporulación, se obtuvo bajo condiciones de iluminación.
- 3- En las condiciones de esta investigación la esporulación del hongo fue mejor bajo un régimen de temperatura fluctuante entre 21 y 30°C; que a temperatura constante comprendidas en dicho rango (23, 25, 27, 29°C).
- 4- La esporulación más abundante se obtuvo en el medio agar jugo V8, con raspado y cosecha de conidio cuatro días después, luz alterna y temperatura fluctuante entre 21 - 30°C.

1.8- Recomendaciones

A raíz de los resultados de este ensayo se puede hacer algunas recomendaciones:

- 1- Realizar trabajos, cualitativos y cuantitativos, sobre la esporulación de *C. fijiensis* utilizando el medio agar jugo VB.
- 2- Realizar investigaciones sobre el efecto de la fluctuación de la temperatura sobre la esporulación del hongo incluyendo tratamientos a oscuridad continua.
- 3- Hacer pruebas utilizando el método que involucra el raspado de la superficie de las colonias y recolección de los conidios cuatro días después, para ver si se detectan fallas y mejorarlas si las hay.
- 4- Realizar pruebas tendientes a determinar el papel de varias fuentes de carbohidratos incluyendo la glucosa en la esporulación del hongo cuando se usan extractos de sus hospederos (banano y plátano).

2- Establecimiento de línea base de sensibilidad en *Mycosphaerella fijiensis* a fungicidas ISE utilizando ascosporas y conidios

2.1- RESUMEN

Se estableció el nivel de sensibilidad en *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas propiconazole y flusilazole, utilizando el método recomendado por el "Comité de Acción en Resistencia a Fungicidas" (FRAC), que utiliza ascosporas y otro método que hacía uso de conidios. Se evaluaron dos localidades: i) con historial de uso de los fungicidas evaluados (Guápiles) y ii) sin historial de aplicación de fungicidas (La Lola).

Las muestras obtenidas en Guápiles procedían de banano, y las que se obtuvieron de La Lola procedían de banano y plátano.

Los datos obtenidos en el ensayo fueron analizados utilizando la función de Saturación, que es dada por la ecuación $Y=(A*X)/(B+X)$, la cual simula muy bien la respuesta en las longitudes de los tubos germinativos de las esporas de *M. fijiensis* a estos tipos de fungicidas. Se encontró que el mejor parámetro que podría utilizarse para definir la sensibilidad del hongo, en la ecuación de Saturación era "A" que indica el máximo porcentaje de reducción que se obtiene sobre la longitud del tubo germinativo de las esporas del hongo. El valor de este parámetro calculado en las poblaciones estudiadas de *M. fijiensis*, varió entre 81 a 91%.

No se encontró diferencia entre las poblaciones del hongo provenientes de las dos localidades, ni entre las poblaciones del hongo provenientes de ambos hospederos, como tampoco se encontró diferencia entre los fungicidas. Se observó que el método que utiliza conidios presenta una variabilidad similar en sus respuestas al método que recomienda la FRAC.

Se pudo observar una gran variabilidad en la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* entre y dentro de las poblaciones estudiadas, siendo más evidente para la población procedente de Guápiles. También se encontró que la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* procedentes de Guápiles eran más cortos que los de la población procedente de La Lola. Asimismo, se observó mayor variabilidad en la respuesta del hongo al fungicida propiconazole que al flusilazole.

2.2- Introducción

La aparición repentina de resistencia en *M. fijiensis* a los fungicidas bencimidazoles, utilizados para combatir la sigatoka negra, provocó su retiro momentáneo en aquellas áreas con poblaciones del patógeno resistentes (Stover 1979, 1980). Al iniciarse el monitoreo de la sensibilidad a estos fungicidas en poblaciones expuestas de *M. fijiensis*, se puede detectar la aparición y/o el nivel de distribución de la resistencia a los fungicidas y de esta manera se pueden implementar las prácticas de manejo para mantener por más tiempo en uso, el fungicida en el control de la enfermedad (Shillingford 1984, Köller y Scheinpflug 1987, Romero y Marín 1989).

El método de monitoreo debe ser sensible para detectar pequeñas variaciones en la población del patógeno y así conocer cuando se pierde la efectividad del producto. La mejor forma de lograr esto es implementando un programa de monitoreo continuo en la población del patógeno (Dekker 1985).

El método de las ascosporas utilizado en la actualidad, no satisface la exigencia de la reproducibilidad de los resultados. No se sabe si la variabilidad es atribuible al método en si o al patógeno mismo (Molina y Salas 1989, Romero y Marín 1989).

Otros métodos de monitoreo de resistencia en *M. fijiensis* hacia fungicidas bencimidazoles se han sugerido, pero no se han probado para fungicidas inhibidores de la síntesis del ergosterol (ISE). Uno de ellos es el uso de conidios del hongo en vez de ascosporas (Fullerton y Tracey 1984), dado que los conidios presentan mayor homogeneidad genética que las ascosporas, de esta manera se podría reducir la variabilidad en las respuestas que se obtienen con el método actual (Stover 1977).

El presente ensayo tiene los siguientes objetivos:

- 1- Establecer una línea base de sensibilidad en dos poblaciones de *M. fijiensis* (con y sin historial de los fungicidas a probar) a los fungicidas propiconazole y flusilazole utilizando conidios y ascosporas del hongo.
- 2- Determinar si el método que involucra el uso de conidios de *M. fijiensis*, presenta menos variabilidad en los resultados que utilizando ascosporas del hongo.

2.3- Revisión de Literatura

2.3.1- Resistencia de patógenos a fungicidas de acción específica.

2.3.1.1- Definición de resistencia a fungicidas.

El desarrollo de resistencia a fungicida es un ajuste estable y hereditario de un hongo hacia un fungicida, que da por resultado una menor sensibilidad a ese fungicida. El término es usado generalmente para cepas de especies sensibles que han cambiado, usualmente por mutación, para ser menos sensible a un tóxico (Delp y Dekker 1985).

2.3.1.2- Surgimiento de la resistencia a fungicidas de acción específica.

La resistencia a una sustancia puede ser causado por varios mecanismos: a) modificación del sitio sensible al fungicida en el metabolismo del hongo; b) escape de un sitio del metabolismo afectado por el desarrollo de una vía alterna; c) cambio en la membrana citoplasmática, resultando en una disminución en la captación o un aumento en la excreción del tóxico y d) detoxificación o una baja conversión en sustancia tóxica (Dekker 1976, 1986b).

Los organismos son capaces de adquirir resistencia a muchas sustancias tóxicas ya sea por reajuste de su material genético o a través de la adquisición de genes adicionales de fuentes externas (Georgopoulos 1986).

2.3.1.3- Factores que afectan el desarrollo de la resistencia a los fungicidas.

Según Dekker (1976, 1985, 1986a), los factores que afectan el desarrollo de la resistencia son:

- a) la adaptabilidad de las cepas resistentes una relación entre resistencia y adaptabilidad reducida disminuye el riesgo de resistencia;
- b) el tipo de enfermedad y el ciclo de vida del patógeno: la resistencia puede propagarse más rápido con un patógeno que tenga una abundante esporulación y un ciclo de infección repetitivo que un patógeno del suelo de propagación lenta;
- c) la presión de selección del fungicida: esta depende de la dosis, frecuencia y cobertura de la aplicación, persistencia y eficiencia del fungicida, y
- d) condiciones ambientales tales como: clima propicio para la enfermedad y la posibilidad de ingreso de células sensibles de campos no tratados.

2.3.1.4- Mecanismos de Resistencia a los Fungicidas

Existen dos formas en que se presenta la resistencia hacia los fungicidas:

- a) Cuantitativamente, por medio de una pérdida gradual de la sensibilidad al producto; bajo esta forma la población inicial se manifiesta por una distribución unimodal en cuanto a resistencia con un desarrollo gradual de ésta con el tiempo y
- b) Cualitativamente, a través del establecimiento de una nueva población, del patógeno, altamente resistente al producto; bajo esta forma la población inicial del patógeno se manifiesta por una distribución bimodal, en cuanto a resistencia, donde hay una alta frecuencia de individuos sensible y otro grupo con una baja frecuencia de individuos resistentes, con el tiempo se va invirtiendo las proporciones en presencia del fungicida (Skylakakis 1982, 1983, 1985; Wolfe 1982; Georgopoulos y Skylakakis 1986; Köller y Schenpflug 1987).

Se considera que se manifiesta la respuesta cuantitativa en los fungicidas ISE (Skylakakis 1982, Köller y Schenpflug 1987).

2.3.1.5- Resistencia cruzada y múltiple a fungicidas

La resistencia cruzada es aquella que se manifiesta a dos o más fungicidas de acción similar, y es controlada por el mismo factor genético. Y la resistencia múltiple es aquella que se manifiesta a dos o más fungicidas no relacionadas, y es controlada por diferentes factores genéticos (Delp y Dekker 1985, Georgopoulos 1986).

Se ha establecido que todos los fungicidas ISE, que actúan a nivel de la inhibición de la demetilización del C-14, provocan resistencia cruzada entre ellos (Siegel 1981, Buchenauer y Hellwald 1985, De Waard 1986).

2.3.2- Fungicidas inhibidores de la síntesis del ergosterol.

2.3.2.1- Características de los Fungicidas inhibidores de la síntesis del ergosterol.

Según Fuchs (1982), los fungicidas ISE tienen las siguientes particularidades: 1-Poseen un anillo que contiene al menos un átomo de nitrógeno; 2-Poseen al menos un átomo asimétrico (aunque hay excepciones), y 3-Interfieren con la síntesis del ergosterol inhibiendo la demetilización del carbono número 14 (excepciones).

2.3.2.2- Clasificación de los fungicidas inhibidores de la síntesis del ergosterol.

Fuchs (1982), clasifica los fungicidas ISE de acuerdo al anillo que contiene el átomo de N₂.

Con un sistema de anillo saturado

- 1-Con dos átomos de nitrógeno: PIPERAZINAS (Triforine),
- 2-Con un átomo de nitrógeno y otro de oxígeno: MORFOLINAS (Tridemorph, Fenpropimorph, Dodemorph)

Con un sistema de anillos insaturados

1-Con un átomo de nitrógeno en un anillo de seis átomos:
PYRIDINAS (Buthiobate, EL-241)

2-Con dos átomos de nitrógeno en un anillo de seis átomos:
PYRIMIDINAS (Ancymidol, Fenarimol, Nuarimol, Triarimol)

3-Con dos átomos de nitrógeno en anillo de cinco átomos:
IMIDAZOLES (Clotrimazole, Dodecyl-imidazole, Econazole, Imazalil, Ketonazole, Miconazole, Phenapronil, Prochloraz, XE 326)

4-Con tres átomos de nitrógeno en un anillo de cinco átomos:
TRIAZOLES (Bitertanol, Propiconazole, Diclobutrazol, Fluotrimazole, Triadimefon, Triadimenol Flusilazole).

2.3.2.3- Mecanismos de acción de los fungicidas inhibidores de la síntesis del ergosterol.

Siegel (1981) y De Waard (1986), dividieron los fungicidas ISE en dos categorías, de acuerdo con el sitio exacto de acción:

a) inhibidores de la demetilización del carbono número 14 (C-14), esta categoría incluye todos los derivados de los imidazoles, piridinas, pirimidinas y triazoles; el fungicida se une al citocromo P-450 por medio de la reacción de la hidrolización microsomal del grupo metil C-14 en uno de los precursores del ergosterol inhibido (lanosterol), esto conduce a una acumulación de metabolitos intermedios del ergosterol y un agotamiento del contenido de ergosterol del micelio;

b) morfolinás, estos productos no interfieren con la demetilización de C-14 pero inhibe la reductasa C-14 y la $\Delta^{8(9)} \longrightarrow \Delta^8$ isomerasa. Las consecuencias de estos dos mecanismos es la reducción del ergosterol, en la célula del hongo, el cual es un constituyente esencial de las membranas de los hongos, por lo que causa un cese de la síntesis normal de la membrana y del crecimiento del hongo.

Büchel (1982), señala que los fungicidas ISE interfieren con la biosíntesis de los esteroides en los hongos e inhiben la biosíntesis del ergosterol a través de la inhibición de la demetilización en las posiciones de los carbonos 4 y 14 del lanosterol, el cual es un precursor del ergosterol.

2.3.2.4- Resistencia a fungicidas inhibidores de la síntesis del ergosterol, en laboratorio y campo.

La selección de mutantes resistentes a los fungicidas ISE se obtiene rápidamente sobre medios de cultivo que contienen fungicidas a concentraciones letales. La frecuencia de mutación hacia resistencia a estos fungicidas es mayor que la de otros fungicidas de acción por sitio específico (De Waard 1986).

Se puede decir que el nivel máximo de resistencia en mutantes de laboratorio es bastante bajo, comparado con otros fungicidas de acción por sitio específico. La relación de la CE_{50} de los individuos resistentes a la CE_{50} de los individuos susceptibles ($CE_{50}(R):CE_{50}(S)$), de estos fungicidas, generalmente está alrededor de 10 mientras que para otros fungicidas de acción por sitio específico (bencimidazoles) está alrededor de 100-1000 (De Waard 1986).

Las cepas resistentes a estos fungicidas presentan una baja adaptabilidad comparadas a las cepas normales en ausencia del fungicida (Dekker 1985).

Buchenauer y Hellwald (1985) y Wolfe (1985), señalan que desde 1980 se ha detectado una baja en la sensibilidad de *Erysiphe graminis f.sp hordei* a Triadimefon en Inglaterra tres años luego de empezar a utilizar el fungicida.

Wolfe (1985), indica que en el transcurso de un ciclo de cultivo en ausencia de Triadimefon la frecuencia de cepas resistentes puede bajar considerablemente, aunque también

señala que la patogenicidad de las cepas insensibles aumenta a través de los ciclos de cultivo compitiendo con las cepas sensibles en ausencia de fungicidas. Estas dos observaciones parecen contradictorios.

El grupo de trabajo sobre fungicidas ISE de la FRAC (FRAC 1989), señalan una baja en la sensibilidad de *E. graminis*, *Venturia inaequalis*, *Uncinula necator* y *Penicillium digitatum* a estos fungicidas. Steva et al. (1989), informan de la baja en sensibilidad de *Uncinula necator* a Triadimenol.

2.3.3- Métodos para la detección de resistencia a fungicidas en *Mycosphaerella fijiensis*.

2.3.3.1- Métodos utilizados para fungicidas bencimidazoles.

Los métodos hasta ahora utilizados para la detección de resistencia en *M. fijiensis*, han dado buenos resultados cuando se aplica a bencimidazoles. Por cuanto el mecanismo de acción de estos fungicidas produce resultados que se evalúan mejor con este método.

Se han evaluado los niveles de resistencia a estos fungicidas usando diferentes estructuras del hongo.

Stover (1977) basó su sistema de monitoreo en función del tipo de germinación (normal, corto, deformado, no germinado) de las ascosporas en agar agua con benomil; esta es una metodología que evalúa aspectos cualitativos. Este método está descrito en un boletín técnico de Dupont (SIGATOKA NEGRA..., 1982).

Bureau et al. (1982), evaluando el mismo fungicida, pero sobre *M. musicola*, comparó el crecimiento de colonias de este hongo sobre agar jugo V8 con y sin benomil. Aunque estableció la presencia de poblaciones resistentes al

fungicida no explicó, que criterios utilizó para definir sus resultados en función de ausencia o presencia de resistencia.

Fullerton y Tracey (1984) evaluaron las mismas clases de fungicidas sobre *M. fijiensis*, usaron el parámetro del tipo de germinación de los conidios y crecimiento de fragmentos de las hifas del hongo. Sistema parecido utilizó Cronshaw (1984) en *M. musicola*, con los conidios del hongo.

De hecho estos métodos han dado buenos resultados para la detección de resistencia a fungicidas bencimidazoles, por su mecanismo de acción; a través del cual previene la germinación de las esporas y las que germinan presentan una gran distorsión en sus tubos germinativos (Stover 1969). Estos parámetros son fáciles de evaluar cualitativamente (sí o no) con lo que resulta muy confiable los valores calculados de CE_{50} y DE_{50} utilizando el clásico análisis de próbitos.

2.3.3.2- Métodos utilizados para detectar resistencia a fungicidas inhibidores de la síntesis del ergosterol.

La metodología utilizada actualmente es aquella propuesta por el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (FRAC 1988), y que es similar a la recomendada por Dupont (SIGATOKA NEGRA..., 1982) para el monitoreo de resistencia a bencimidazoles. Esta consiste en la medición de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas luego de 48 horas, germinadas en agar agua-fungicida y compararlas con un testigo sin fungicida, en términos de reducción de la longitud del tubo germinativo. Este parámetro, contrario a los considerados para los bencimidazoles, es cuantitativo.

2.3.3.3- Análisis de los datos

Molina y Salas (1989), para analizar sus datos de reducción del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, utilizaron el análisis de próbitos para determinar las EC_{50}

de varias poblaciones del hongo ante el fungicida propiconazole.

Por su parte Romero y Marín (1989), utilizaron tres diferentes ecuaciones matemáticas para determinar las EC_{50} .

2.3.3.4- Consideraciones en que se basa el método actual

Este método está basado en algunos supuestos implícitos, no del todo cierto, como son: una población del patógeno con características genéticas lo bastante homogéneo como para ser delimitado con una misma media (poblacional), dentro y entre plantaciones; o que las respuestas del patógeno serán las mismas independientemente de las condiciones climáticas. Las inconsistencia de estos supuestos, han hecho que en cada laboratorio en que se realizan las pruebas de monitoreo de resistencia en *M. fijiensis* a los fungicidas ISE, se obtienen resultados diferentes (Molina 1989, Romero y Marín 1989).

Esta variabilidad en las respuestas hace pensar que el método, bajo los criterios originales, no es funcional y que debe ser modificado atendiendo supuestos verdaderos.

2.4- Materiales y Métodos

2.4.1- Establecimiento de línea base de sensibilidad con ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

Para establecer la línea base de sensibilidad en *M. fijiensis* a los triazoles, flusilazole y propiconazole utilizando ascosporas; se realizó la descarga de éstas sobre agar agua (2%), conteniendo diferentes concentraciones de los fungicidas, y posteriormente se incubó por 48 horas a 26°C.

Los fungicidas utilizados provenían de formulaciones comerciales; el flusilazole, formulado en forma de concentrado emulsificable al 40% y el fungicida propiconazole formulado en forma de concentrado emulsificable al 25%. Estos fungicidas fueron obtenidos del laboratorio de sanidad vegetal de la Asociación Bananera Nacional (ASBANA) en Guápiles.

Para hacer el medio agar-agua-fungicida se preparaban en cantidad de 100 ml (matraz volumétrico) diferentes concentraciones del fungicida en agua, para poder añadirle a 95,5 ml de agar-agua a 45°C, 0,5 ml de la solución del fungicida con el fin de hacer el medio agar-agua-fungicida a las distintas concentraciones, luego de añadido los 0,5 ml de solución de fungicida al medio dentro de un erlenmeyer se agitaba esta, para mezclar el fungicida con el agar agua.

Para realizar la descarga de ascosporas de *M. fijiensis* se procedió a tomar muestras de tejido foliar necrótico y utilizando un sacabocado de 13 mm de diámetro se tomaron secciones que presentaban abundante peritecios, y se colocaron cinco de éstas con el haz hacia arriba sobre un pedazo de papel bond común de 14 cm x 11 cm. Estos papeles, con las secciones de tejido, se colocaban en agua destilada por 10 minutos, después se eliminaba el exceso de agua, colocándolos sobre papel toalla. Posteriormente se colocaban

sobre platos Petri, con agar-agua y fungicida, entonces sobre el papel se colocaban la tapa del plato Petri, se marcó con un lápiz de cera el fondo del plato Petri en la parte que coincidía con las secciones de tejido para poder localizar el lugar donde estarían las ascosporas. Se dejó por 1,5 hr y luego se retiró el papel con las secciones de tejido de cada plato Petri para luego ponerlos a incubar a 26°C en oscuridad.

Esto se hizo para las siguientes concentraciones (ppm): 0,01, 0,02, 0,025, 0,05, 0,10, 0,50, 1, 2, 4, 5, 8, 16 y 32 ppm. En la población de Guápiles se aplicaron todas estas concentraciones de los fungicidas, pero en la población de La Lola no se usaron las concentraciones de 0,025, 2, 4, 5, 16 y 32 ppm.

Se midió el tubo germinativo más largo de 30 ascosporas por plato Petri y se realizaron dos repeticiones por concentración del fungicida.

La medición del tubo germinativo de las ascosporas se realizó colocando el plato Petri directamente bajo el microscopio y midiendo de seis a diez ascosporas por campo; se usaba un aumento de X100 y la medición se realizó por medio de un lente micrométrico dentro de un ocular calibrado previamente con un micrómetro de platina.

Las muestras de *M. fijiensis* provinieron de dos localidades de la provincia de Limón, en la República de Costa Rica: uno con historial de aplicación de fungicidas ISE (una parcela experimental de ASBANA en Guápiles), y otra sin historial de aplicación de fungicidas ISE (una finca del CATIE, La Lola).

2.4.2- Establecimiento de Línea Base de sensibilidad con Conidios de *Cercospora fijiensis*.

Para la determinación de la línea base de sensibilidad a estos dos fungicidas usando conidios de *C. fijiensis*, se procedió de la siguiente manera: se esterilizó 100 ml de agua conjuntamente con un pincel y un beaker de 50 ml en un autoclave. Luego se procedió a tomar un plato Petri con abundante crecimiento y esporulación del hongo (medio agar jugo V8 modificado según Mourichon *et al.* 1987) y bajo condiciones asépticas se vertió, sobre el medio con el hongo, 10 ml de agua estéril y se raspó la superficie del cultivo con el pincel estéril para luego transferir esta suspensión a un beaker estéril, se tomó una alicuota por medios asépticos y se determinó la cantidad de conidios *C. fijiensis* usando un hematocímetro. Posteriormente se transfirieron a los platos Petri, que contenían el agar agua (2%)-fungicidas a diferentes concentraciones (0, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 ppm) con 200 μ l de la solución, que equivalía a 8.880 conidios/plato Petri.

Se incubaron por 24 horas a 26°C; no se incubó por 48 horas, porque se producía un crecimiento muy denso para las concentraciones inferiores y no se podía determinar la diferencia entre conidios, conidioforos y micelio.

Se midieron los tubos germinativos que salían de la parte lateral o proximal (extremo que se une al conidioforo), del conidio en vez del que salía de la parte terminal, esto es porque no se podía determinar exactamente el punto de crecimiento inicial del tubo germinativo que procede del extremo del conidio.

Para realizar las mediciones, luego de las 24 horas se colocaron los platos Petri directamente bajo el microscopio y utilizando el objetivo de 10X se realizaron las mediciones

por medio de un lente micrométrico dentro de un ocular. Se midieron de seis a diez conidios por campo.

2.4.3- Modelo matemático utilizado para determinar la línea base de sensibilidad en ambos métodos.

Se utilizó la función de saturación (Arneson 1988), por cuanto refleja el comportamiento del patógeno ante los fungicidas ISE, esta función está dada por la siguiente ecuación: $Y=AX/(B+X)$, donde "Y" representa el porcentaje de reducción del tubo germinativo de las esporas, "A" representa el máximo porcentaje de reducción que sufre la longitud del tubo germinativo bajo el efecto del fungicida, "X" representa la concentración del fungicida y "B" (CE_{50}) representa la concentración del fungicida que permite obtener la mitad del máximo porcentaje de reducción del tubo germinativo ($A/2$).

Estos parámetros son los que establecerán la línea base de sensibilidad en *M. fijiensis*, de las distintas localidades (Guápiles y La Lola) y métodos (ascosporas o conidios) ante los fungicidas Propiconazole y Flusilazole.

2.5- Resultados

2.5.1- Con Ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

2.5.1.1- Población de Guápiles.

El resultado obtenido para esta población de *M. fijiensis* de banano se presenta en la Tabla 2.1, donde se muestra la longitud del tubo germinativo de las ascosporas sometidas a las distintas concentraciones de ambos fungicidas (propiconazole y flusilazole), así como el porcentaje de reducción obtenido para cada concentración del fungicida

Los datos de la Tabla 2.1, indican que a concentraciones superiores de los fungicidas, la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* tiende a ser similar independientemente del fungicida. Esto indica que el efecto de los fungicidas ISE llega a cierto límite encima del cual la respuesta del patógeno tiende a ser casi nula. También se evidencia en el porcentaje de reducción de los tubos germinativos los cuales tienden a quedar entre los 80 y 87% a pesar de que la concentración del fungicida haya aumentado, más de 300 veces.

Las Figuras 2.1 y 2.2 corresponden a las gráficas del porcentaje de reducción, observado y la predicho con la ecuación de saturación, ante las concentraciones del fungicida, para propiconazole y flusilazole respectivamente, que muestra el comportamiento de la población de *M. fijiensis*, de Guápiles ante varias concentraciones de estos fungicidas.

TABLA 2.1 Longitud y porcentaje de reducción de la longitud de los tubos germinativos de ascoporas de *Mycosphaerella fijiensis* de Guápiles ante los fungicidas propiconazole y flusilazole.

Concentración (ppm)	propiconazole		flusilazole	
	Longitud (micras)	Reducción (%)	Longitud (micras)	Reducción (%)
0,00	145,5	0	151,8	0
0,01	82,6	43,26	61,7	59,35
0,02	73,1	49,79	-----	-----
0,025	45,6	68,62	48,9	67,78
0,05	34,0	76,64	31,5	79,26
0,10	29,8	79,51	28,8	81,01
0,50	25,7	82,33	-----	-----
1,00	28,9	80,15	24,9	83,61
2,00	35,5	75,61	22,1	85,44
4,00	28,4	80,47	23,7	84,37
5,00	29,5	79,74	21,1	86,06
8,00	27,7	80,93	21,3	85,95
16,00	27,1	81,38	24,4	83,88
32,00	18,5	87,29	22,8	84,94

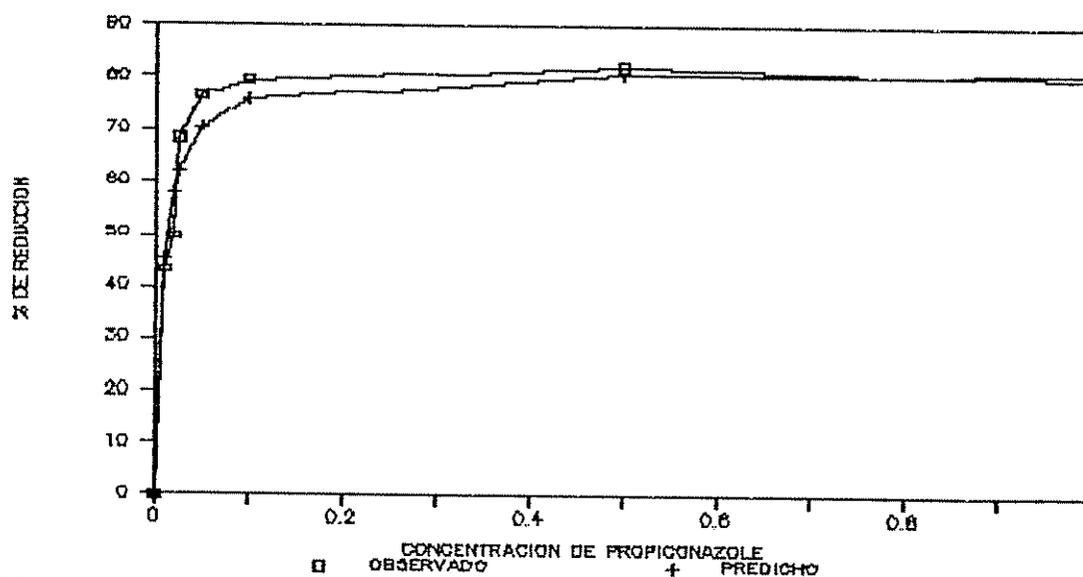


Figura 2.1 Reducción de la longitud del tubo germinativo de *M. fijiensis* de Guápiles a diferentes concentraciones de propiconazole.

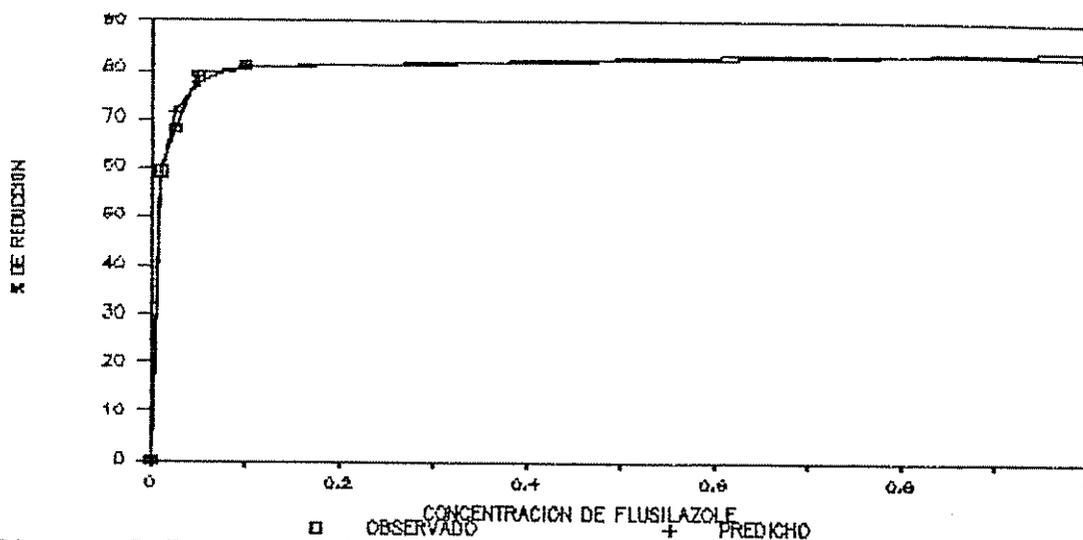


Figura 2.2 Reducción de la longitud del tubo germinativo de *M. fijiensis* de Guápiles a diferentes concentraciones de flusilazole

La Tabla 2.2, presenta los valores de la concentración del fungicida (B o CE_{50}) necesaria para producir un 50% , de la máxima reducción de los tubo germinativos obtenido por el fungicida y del máximo porcentaje de reducción (A), conjuntamente con sus intervalos de confianza, para cada fungicida. Estos datos muestran que la respuesta de *M. fijiensis* al fungicida propiconazole fue más variable que a flusilazole por el rango más amplio de los intervalos de confianza que presenta los parámetros obtenidos con propiconazole.

TABLA 2.2 Valores de la concentración del fungicida (B) y del máximo porcentaje de reducción del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* (A), de Guápiles.

Parámetro	propiconazole	flusilazole
A	82,08	84,79
Inferior ^a	79,21	83,61
Superior ^a	84,95	85,98
B (CE ₅₀)	0,0081	0,0047
Inferior ^b	0,0056	0,0039
Superior ^b	0,0107	0,0055

^aLímites de confianza inf. y sup. para A de cada fungicida en porcentaje.

^bLímites de confianza inf. y sup. para B de cada fungicida en ppm.

2.5.1.2- Población de *Mycosphaerella fijiensis* de La Lola.

Los resultados del ensayo sobre la población de *M. fijiensis* de esta localidad, ante los fungicidas propiconazole y flusilazole están dadas en las Tablas 2.3 y 2.4, respectivamente, donde se muestra la reacción de *M. fijiensis* procedente de ambos hospederos (banano y plátano) indicando la longitud y el porcentaje de reducción de sus tubos germinativos. No se observó un efecto del hospedero sobre la reacción del patógeno al fungicida.

Las Figuras 2.3 y 2.4, corresponden a la graficación del porcentaje de reducción del tubo germinativo de las ascosporas, de *M. fijiensis* de banano y plátano, bajo varias concentraciones de los fungicidas propiconazole y flusilazole, respectivamente.

TABLA 2.3 Longitud y porcentaje de reducción del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* procedente de La Lola en banano y plátano en varias concentraciones de propiconazole.

Concentración (ppm)	Banano		Plátano	
	Longitud (micras)	Reducción (%)	Longitud (micras)	Reducción (%)
0.00	184,2	0,0	189,7	0,0
0.01	114,6	37,81	120,2	36,63
0.02	65,9	64,21	62,9	67,20
0.05	55,0	70,17	44,5	76,53
0.10	43,1	76,63	34,4	81,88
0.50	42,3	77,04	40,1	78,85
1.00	36,9	79,95	37,9	81,08
8.00	32,9	82,14	31,2	83,56

TABLA 2.4 Longitud y porcentaje de reducción del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* procedente de La Lola en banano y plátano en varias concentraciones de flusilazole.

Concentración (ppm)	Banano		Plátano	
	Longitud (micras)	Reducción (%)	Longitud (micras)	Reducción (%)
0.00	212,2	0,0	255,7	0,0
0.01	199,4	6,03	228,5	12,82
0.02	201,9	4,88	171,1	32,09
0.05	143,6	32,20	151,5	40,75
0.10	85,1	59,89	75,8	70,37
0.50	48,5	77,18	65,1	74,53
1.00	38,5	81,88	38,1	85,11
8.00	38,5	82,74	32,8	87,18

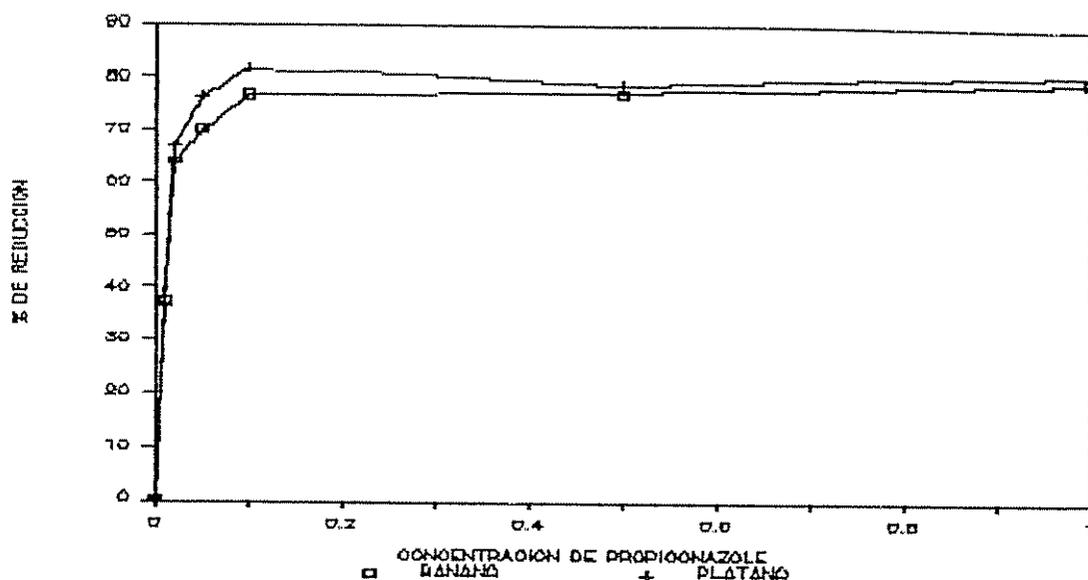


Figura 2.3 Efecto de varias concentraciones de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de La Lola.

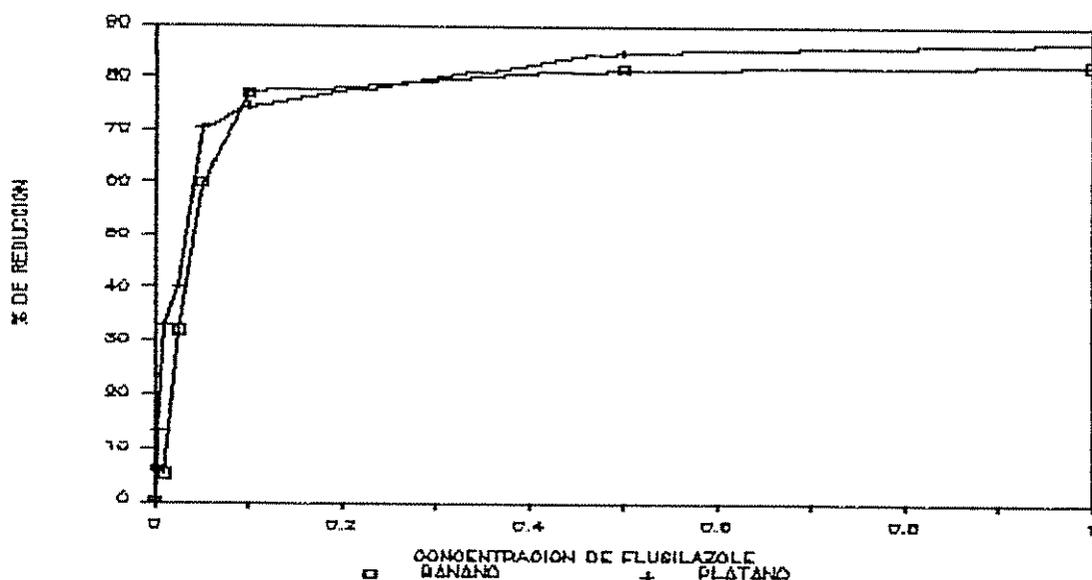


Figura 2.4 Efecto de varias concentraciones de flusilazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de La Lola.

La Tabla 2.5, presenta los valores de la concentración del fungicida (B o CE_{50}) necesaria para producir un 50% , de la máxima reducción de los tubo germinativos obtenido por el fungicida y del máximo porcentaje de reducción (A), conjuntamente con sus intervalos de confianza, para cada fungicida. En estos valores se nota el hecho de que a mayor longitud del tubo germinativo de las ascosporas (Tabla 3.3 y 3.4), mayor porcentaje de reducción.

TABLA 2.5 Valores de la concentración del fungicida (B) y del máximo porcentaje de reducción (A) del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de La Lola.

Parámetro	propiconazole		flusilazole	
	Banano	Plátano	Banano	Plátano
A	81,62	84,26	90,95	89,392
Inferior ^a	76,31	76,52	73,77	80,927
Superior ^a	86,92	91,99	108,14	97,862
B (CE_{50})	0,0085	0,0083	0,0358	0,0214
Inferior ^b	0,0048	0,0034	0,0095	0,0130
Superior ^b	0,0121	0,0132	0,0620	0,0299

^aLímites de confianza inf. y sup. para A de cada fungicida en porcentaje.

^bLímites de confianza inf. y sup. para B de cada fungicida en ppm.

2.5.2- Con Conidios de *Cercospora fijiensis*.

La respuesta de *C. fijiensis*, de la población de Guápiles, a los fungicidas (ISE) propiconazole y flusilazole se presenta en la Tabla 2.6, en donde se muestra la longitud y el porcentaje de reducción del tubo germinativo de los

conidios luego de 24 horas de ser sometido a los fungicidas. La respuesta no es igual para ambos fungicidas porque con el fungicida flusilazole se presenta una reacción relativamente proporcional a las distintas concentraciones del fungicida, en cambio para propiconazole se presenta una respuesta errática, aunque en términos generales siempre tiende a reducir la longitud del tubo germinativo.

TABLA 2.6 Longitud y porcentaje de reducción del tubo germinativo de conidios de *Cercospora fijiensis* de Guápiles bajo propiconazole y flusilazole, a las 24 horas.

Concentración (ppm)	propiconazole		flusilazole	
	Longitud (micras)	Reducción (%)	Longitud (micras)	Reducción (%)
0,00	83,9	0	83,9	0
0,005	47,5	43,38	71,6	14,66
0,01	56,9	32,18	62,0	26,10
0,05	58,0	30,87	43,0	48,75
0,10	24,5	70,80	34,4	59,00

La Tabla 2.7 presenta los valores de la concentración del fungicida (B o CE_{50}) necesaria para producir un 50% de la máxima reducción de los tubos germinativos obtenido por el fungicida y del máximo porcentaje de reducción (A), para las concentraciones dadas del fungicida, conjuntamente con sus intervalos de confianza para cada fungicida. Los valores de los parámetros obtenidos para propiconazole muestran una gran variabilidad representado en los rangos para ambos intervalos de confianza.

El comportamiento de la población de *C. fijiensis*, de Guápiles, en función del porcentaje de reducción de la

longitud de los tubos germinativos de sus conidios ante las distintas concentraciones de los fungicidas, se puede observar en la Figura 2.5. Allí se ve que la respuesta al fungicida propiconazole no es la más típica para un fungicida por que a medida que aumenta la concentración del fungicida propiconazole, no disminuye de manera normal la longitud del tubo germinativo de los conidios procedentes de cultivos monospórico de la población de Guápiles.

TABLA 2.7 Valores de la concentración del fungicida (B), y del máximo porcentaje reducción del tubo germinativo de conidios de *C. fijiensis* (A), así como el intervalo inferior y superior de cada parámetro de la población de Guápiles.

Parámetro	propiconazole	flusilazole
A	51,80	67,91
Inferior ^a	5,53	61,17
Superior ^a	98,08	74,64
B	0,0024	0,0173
Inferior ^b	-0,0111	0,0117
Superior ^b	0,1594	0,0229

^aLimites de confianza inf. y sup. para A de cada fungicida en porcentaje.

^bLimites de confianza inf. y sup. para B de cada fungicida en micras.

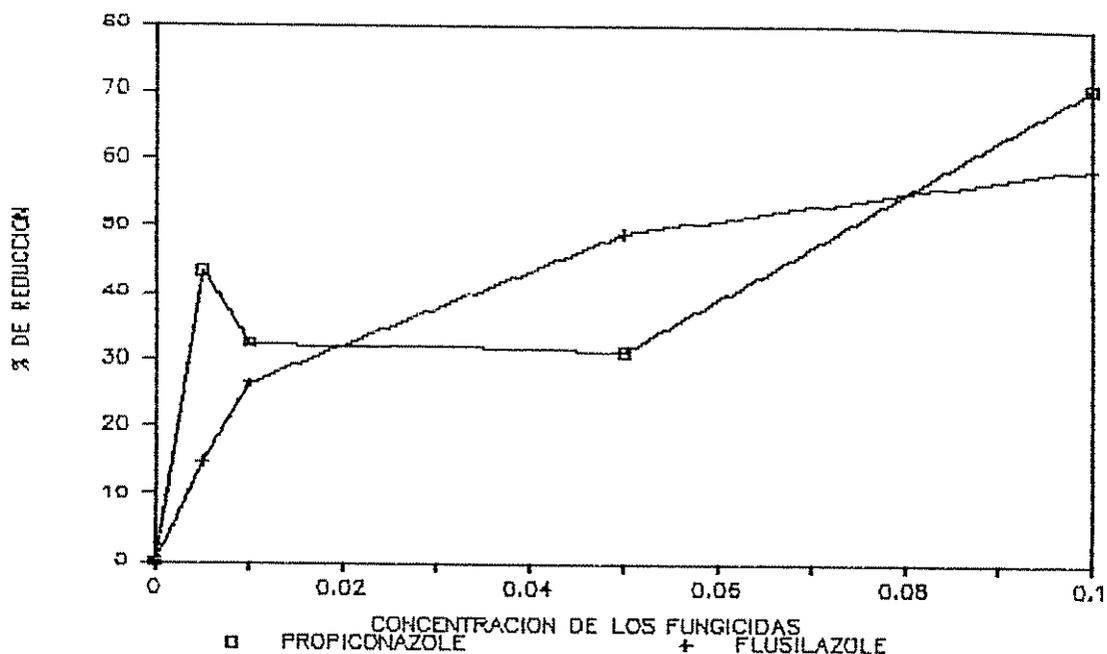


Figura 2.5 Reducción de la longitud del tubo germinativo de conidios de *C. fijiensis* usando varias concentraciones de propiconazole y flusilazole en la población procedente de Guápiles.

Los conidios de *C. fijiensis* de la población de La Lola solo fueron sometidos a un fungicida, Propiconazole. Estos conidios fueron incubados por 54 horas por lo que las longitudes de sus tubos germinativos son bastante largas.

En la Tabla 2.8, se presenta el valor de la longitud y el porcentaje de reducción de los tubos germinativos de los conidios de *C. fijiensis* de la población de La Lola que fue sometida al fungicida propiconazole, durante 54 horas. Estos datos indican el rápido crecimiento de los tubos germinativos de los conidios y de las hifas del hongo, lo cual dificultaría las mediciones si tuviesen que realizarse después de 48 a 54 horas.

TABLA 2.8 Longitud y porcentaje de reducción de los tubos germinativos de conidios de *Cercospora fijiensis* sometidas a propiconazole, a las 54 horas.

Concentraciones (ppm)	Longitud (micras)	Reducción (%)
0,00	527,8	0
0,005	466,0	11,71
0,01	347,8	34,11
0,05	135,5	74,32
0,10	101,1	80,83

2.5.3- Comportamiento de la longitud de los tubos germinativos de las ascosporas de la población de Guápiles en función de la fecha de descarga.

La Tabla 2.9, contiene los valores de la longitud del tubo germinativo de los testigos para las ascosporas de *M. fijiensis* de la población de Guápiles. Estas ascosporas corresponden a un mismo lugar y fecha de muestreo, lo único que varía es la fecha de descarga de las ascosporas.

TABLA 2.9 Longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* de testigos de Guápiles, para cada fecha de descarga.

Fecha de descarga	Longitud (micras)
23/2/89	187,0
26/2/89	95,0
28/2/89	164,5
2/3/89	120,0
3/3/89	82,0
4/3/89	66,0
6/3/89	168,2
8/3/89	119,5
11/3/89	177,8

La Figura 2.6, corresponde a la graficación de los datos de la Tabla 2.9, donde se observa la gran variabilidad de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* procedentes de una misma muestra y de un mismo lugar (Guápiles), en las cuales solo varía la fecha de descarga. En esta gráfica la fecha cero corresponde al día 23/2/89.

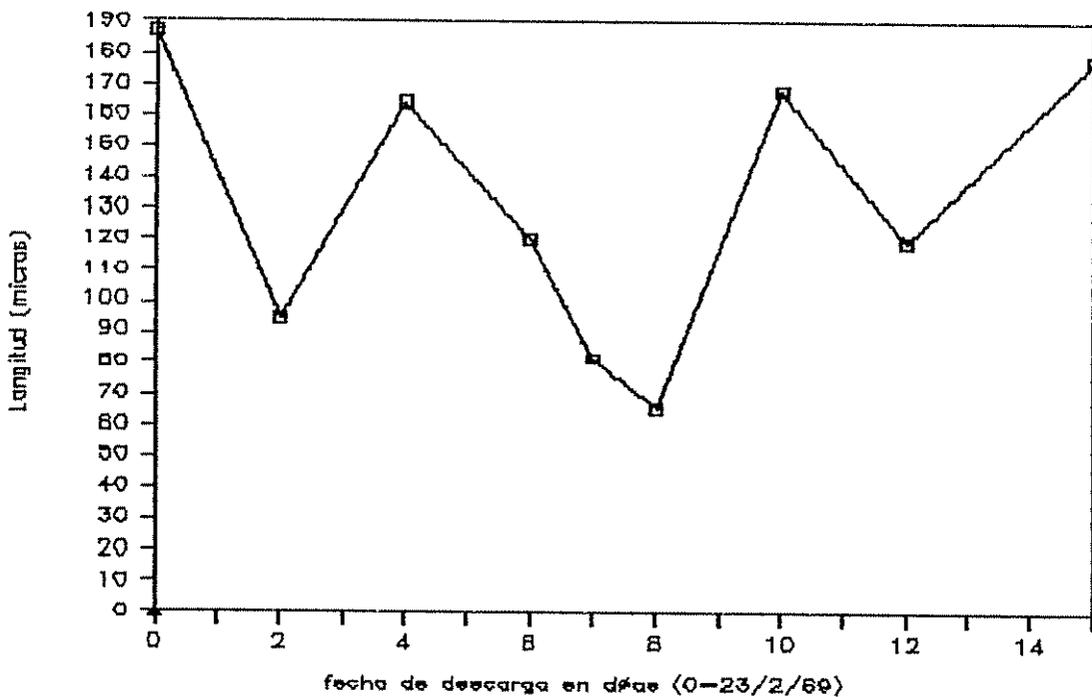


Figura 2.6 Longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de descargas realizadas en varias fechas, procedentes de la misma muestra tomada en Guápiles.

2.6- Discusión

Establecimiento de línea base de sensibilidad en *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas, propiconazole y flusilazole usando la función de saturación.

Es importante señalar que el método utilizado para analizar los datos de este ensayo no es la que comunmente se emplea. Se trata de una metodología diferente a la tradicional que utiliza generalmente el análisis de próbitos.

El uso del análisis de próbitos es lo más adecuado cuando se trata con parámetros cualitativos, pero en el caso de este ensayo el parámetro que se evaluó fue la longitud de los tubos germinativos a las distintas concentraciones de los fungicidas, es un parámetro cuantitativo y tampoco tiene distribución normal. En vista del cual no se debería utilizar el análisis de próbitos y tratar con otros modelos matemáticos que expliquen y/o simulen mejor la respuesta del patógeno a los fungicidas ISE como lo sugiere la INIBAF (1989).

La reacción que causa los fungicidas ISE en las ascosporas y conidios, de *M. fijiensis*, se manifiesta en una función de saturación a concentraciones del fungicida relativamente bajas por lo que el uso de una ecuación que simule esa situación es lo más deseable para analizar los datos obtenidos en este ensayo.

El usar la ecuación de saturación para analizar los datos de esta clase de ensayo con fungicidas ISE tiene la ventaja de que suministra dos datos útiles: i) el valor de la máxima reducción de los tubos germinativos de las esporas, bajo las concentraciones utilizadas de los fungicidas y ii) la CE_{50} para la máxima reducción obtenida con el fungicida. Además como explica el comportamiento del patógeno ante los fungicidas, se pueden analizar los valores de reducción del

tubo germinativo con concentraciones altas del fungicida, cosa que no pueden hacer otras ecuaciones utilizadas para analizar estos datos (Romero y Marín 1989).

De los dos parámetros que se derivan de la ecuación de saturación es más conveniente utilizar el parámetro "A" por su menor variabilidad; el parámetro "B" es dependiente de "A" y si se aplican sobre poblaciones que presentan tubos germinativos relativamente largos como lo fueron para la población de La Lola se obtendrán valores de "A" altos y por consiguiente valores de "B" también altos lo cual podría hacer pensar con base en el valor de ese parámetro que la población tiene algún nivel de resistencia comparada a una población que presenta tubos germinativos de sus ascosporas relativamente corto como en el caso de Guápiles.

El uso de ascosporas de *M. fijiensis* para determinar una línea base de sensibilidad en este hongo a fungicidas ISE continúa siendo la mejor opción por cuanto es más rápida, más fácil y se presta para trabajar con grandes lotes de muestras, esto último permite detectar con mayor probabilidad cambios en los niveles de sensibilidad de las poblaciones del hongo.

En cambio el uso de conidios de *Cercospora fijiensis* a pesar de que se suponía que sus respuestas serían más homogéneas, presentan niveles de variabilidad similares a las ascosporas en las respuestas a los fungicidas, bajo las condiciones de este ensayo.

Los niveles de reducción de los tubos germinativos de las ascosporas de *M. fijiensis*, de la población de Guápiles, ante los fungicidas propiconazole y flusilazole, no evidencian mayor diferencia por lo que se puede asumir que ambos fungicidas presentan una efectividad similar. Aunque la CE_{50} de ambos difieren, en vista de que no hay un traslape verdadero entre los rangos determinados para cada uno, el

máximo porcentaje de reducción logrado en los tubos germinativos no difieren uno de otro, ya que hay un traslape entre el rango de sus valores. La reducción promedia obtenida por Molina y Salas (1989) sobre varias poblaciones de *M. fijiensis*, en una finca de Honduras, con propiconazole son relativamente menores que para los obtenidos para los de Guápiles, a pesar que la longitud media del tubo germinativo de las ascosporas de Honduras eran mayores; aunque es interesante observar que el valor del parámetro "B" de ambas poblaciones eran similares, el valor del parámetro "A" es mayor para la población de Guápiles (Apéndice 2A).

El máximo porcentaje de reducción obtenido sobre las ascosporas de *M. fijiensis*, de La Lola, sobre los diferentes hospederos (banano y plátano) se logró con el fungicida flusilazole aunque esta no es una diferencia evidente, en cambio las CE_{50} obtenidas por propiconazole es marcadamente inferior que la del fungicida flusilazole, esto es en parte debido a que el fungicida propiconazole tuvo un efecto relativamente menor en cuanto a porcentaje de reducción de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas, que el fungicida flusilazole y por consiguiente un valor de "A/2" menor.

El máximo porcentaje de reducción obtenido de entre las localidades es la que corresponde a la población de La Lola. Esto es debido a que la longitud del tubo germinativo de la población de La Lola era mayor que la de Guápiles y por el tipo de efecto que tiene las concentraciones superiores del fungicida sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas, entonces las muestras con tubos germinativos relativamente largos para sus testigos tendrán también los mayores porcentaje de reducción.

2.7- Conclusiones

Los resultados obtenidos de este ensayo conducen a las siguientes conclusiones:

- 1- El método de detección de resistencia en *M. fijiensis* a los fungicidas ISE (propiconazole y flusilazole) que utiliza conidios del hongo bajo las condiciones de este ensayo no es más efectivo que la que hace uso de sus ascosporas.
- 2- El modelo matemático que se utilizó para establecer la línea base de sensibilidad en las distintas poblaciones de *M. fijiensis* a los fungicidas propiconazole y flusilazole indica que el máximo porcentaje de reducción (A) es el parámetro más indicado por su poca variación.
- 3- No se pudo detectar diferencia entre las poblaciones del hongo sometidas al fungicida propiconazole con base en ninguno de los dos parámetros del modelo matemático utilizado, en cambio con el fungicida flusilazole se pudo detectar diferencia entre las poblaciones de Guápiles y La Lola, con base en el parámetro "B" siendo mayor para la población de La Lola situación que es lógico si se considera que las ascosporas de La Lola presentaban tubos germinativos más largo, por ende un valor de "A/2" mayor que los de la población de Guápiles.
- 4- Existe una gran variabilidad en la longitud de los tubos germinativos de las ascosporas, en las poblaciones de *M. fijiensis* estudiadas.

2.8- Recomendaciones

A la luz de los resultados obtenidos en este ensayo se puede hacer las siguientes recomendaciones:

- 1- Realizar estudios para identificar los factores que influyen en la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, porque este es el parámetro más importante que se tiene, para el monitoreo de la resistencia de este hongo a los fungicidas ISE.
- 2- Si se llega a adoptar el modelo matemático que se utilizó aquí, para el establecimiento de la línea base de resistencia, entonces lo más indicado será utilizar el parámetro "A", que determina el máximo porcentaje de reducción del tubo germinativo de las ascosporas del hongo por el fungicida.
- 3- Establecer una sola forma de analizar los datos para la detección de resistencia en *M. fijiensis* a los fungicidas ISE, ya que en la actualidad se utilizan y recomiendan varios.
- 4- No utilizar el clásico análisis de próbitos para detectar resistencia en *M. fijiensis* a los fungicidas ISE, dado el tipo de parámetro que se mide.

3- Estudio del efecto de humedad, desecación, secuencia de descarga, hospedero, localidad y fungicida sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*

3.1- RESUMEN

Se estudió el efecto que tienen: la humedad, desecación, secuencia de descarga, hospedero, localidad y fungicida sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*. Para esto se procedió a utilizar dos condiciones de humedad (sin y con cámara húmeda por 48 hr), tres secuencias de descarga (descarga cada 48 hr del mismo material), dos localidades (con historial, Guápiles, y sin historial, La Lola, del uso de fungicida) y cinco concentraciones del fungicida propiconazole (0 0,005 0,01 0,05 0,1 ppm).

Se encontró que el uso de la cámara húmeda acelera la madurez de las ascosporas e igualmente aumenta la longitud de sus tubos germinativos.

Se observó que después de una descarga, se necesita 96 horas aproximadamente para que las ascosporas jóvenes maduren cuando no se usa la cámara húmeda, pero cuando se usa entonces este período disminuye. También se pudo detectar que las ascosporas jóvenes son descargadas, pero poseen tubos germinativos más cortos.

El efecto de hospedero indicó que las ascosporas de *M. fijiensis* aisladas de banano generalmente presentaban tubos germinativos más largo. En cuanto a la localidad se encontró que las ascosporas procedente de muestras de Guápiles presentaban tubos germinativos más cortos que los procedentes de La Lola; igualmente se pudo observar que las ascosporas procedente de Guápiles se recuperaban más lentamente de la secuencia de descarga que los de La Lola.

No se pudo observar un efecto diferencial del fungicida sobre la longitud del tubo germinativo de las ascoporas de las distintas poblaciones de *M. fijiensis* estudiadas; aunque si se observó que el fungicida tiende a igualar las longitudes del tubo germinativo de las ascoporas a las concentraciones superiores del fungicida (0,05 a 0,1 ppm) independientemente de la longitud del tubo germinativo de los testigos. Esto indica que no hay diferencia sobre la longitud del tubo germinativo de las ascoporas del hongo a esas concentraciones del fungicida corroborando el efecto de saturación en la respuesta del hongo al fungicida.

3.2- Introducción

En vista de que el método que utiliza conidios (Capítulo 2) para la detección de resistencia en *C. fijiensis* hacia los fungicidas ISE no arroja mejores resultados que las obtenidas con el método recomendado por La FRAC (1988), se hace necesario el estudio de algunos factores que puedan estar involucrados en los resultados con el método de ascosporas de *M. fijiensis*.

Este método es más sencillo que la propuesta con conidios de *C. fijiensis* por lo que sería más indicado mejorarlo que el que utiliza conidios.

En función de esto el presente ensayo tiene por objetivos:

- 1- determinar como afecta la humedad, la madurez de las ascosporas de *M. fijiensis* y por consiguiente en sus descarga y respuesta al fungicida propiconazole.
- 2- estudiar el efecto de las secuencias de descarga de ascosporas, en relación a la respuesta de estas ascosporas al fungicida.
- 3- determinar si existe diferencia entre la población del patógeno sobre diferentes hospederos al igual que si existe una diferencia detectable entre poblaciones del patógeno de diferentes localidades.

Esta información puede arrojar alguna luz sobre el porque de la variabilidad en las respuestas que se obtienen con el método, entre y dentro de poblaciones del patógeno.

3.3- Revisión de literatura

3.3.1- Efecto de la humedad sobre la descarga de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*

Si se desea obtener hojas de banano o plátano con peritecios, de *Mycosphaerella fijiensis*, que contengan ascosporas es necesario realizar el muestreo después de dos o tres días sin lluvia, porque la lluvia promueve la descarga de las ascosporas (SIGATOKA NEGRA..., 1982).

La descarga de las ascosporas, de *Mycosphaerella musicola*, de muestras almacenadas en condiciones de 100% de humedad relativa es mayor que para muestras sometidas a condiciones de humedad más bajas. Aunque para mantener la viabilidad de las muestras por mayor tiempo es mejor someterlas a baja humedad relativa, ya que bajo condiciones de 100% de humedad relativa la descarga de ascosporas es espontánea luego de cinco días (Stover 1971).

Thompson (1941) encontró que la descarga de *M. musiva* se realizaba luego de una lluvia lo suficientemente intensa como para humedecer la hoja con los peritecios del hongo.

Para algunas especies de *Mycosphaerella* se precisa de una humedad relativa mayor que el 90% para la descarga de sus ascosporas (Park y Keane 1982); al igual que para *Venturia inaequalis* (Gilpatrick et al. 1972).

3.3.2- Descarga de ascosporas en función de la maduración de los peritecios y ascosporas

La maduración de ascosporas inmaduras dentro de los peritecios de *M. fijiensis* se obtiene luego de 48 horas sometidas a cámara húmeda (SIGATOKA NEGRA..., 1982).

Solo cuando están maduras los peritecios es que se produce la descarga. Pero la maduración de las ascosporas no

es uniforme dentro del peritecio, por lo que se precisa de un período de descanso luego de una descarga, para el resto de ascosporas inmaduras en *V. inaequalis* (Hirst y Stedman 1962). Se encontró que una segunda descarga de *Venturia inaequalis*, en muchas ocasiones producía una mayor cantidad de ascosporas (Gilpatrick et al. 1972).

Otra investigación, pero con conidios de *Phyllosticta solitaria* demostró que existe una correlación positiva entre la longitud del tubo germinativo y la maduración de las esporas. También se encontró una correlación positiva entre la longitud del tubo germinativo y el porcentaje de germinación (Burgert 1934).

3.4- Materiales y Métodos

3.4.1- Muestras de plátano y banano de La Lola

Se procedió a tomar muestras, de hojas, de plátano y banano de La Lola. De estas muestras se tomaron secciones con abundante peritecios de cada hospedero, con la ayuda de un sacabado de 13 mm de diámetro.

Posteriormente, las secciones se conservaron en dos condiciones: en desecador y en platos Petri, bajo condiciones de laboratorio, por una semana. Luego, una parte de las secciones que estaban en el desecador y otra parte de las que estaban a condiciones de laboratorio fueron colocadas en cámara húmeda, por 48 horas; la otra parte fue sometida a descarga luego de humedecerlas, con agua destilada por 10 minutos, sobre agar-agua (2%) con fungicida a diferentes concentraciones.

Para hacer las pruebas de descarga el material (hospedero y tipo de desecado) fue engrapado sobre un trozo de papel Bond, de 14 cm x 11 cm de superficie, para realizar la descarga durante 1,5 horas, como lo recomienda la FRAC (FRAC 1988).

Con las secciones sometidas a los cuatro tratamientos se realizaron tres descargas, secuenciadas, utilizando el mismo material (previamente descargado), espaciado cada 48 horas.

Se evaluaron los efectos de: la secuencia de descarga (0, 48 y 96 horas); la humedad (sin y con cámara húmeda), del hospedero (plátano y banano), del tipo de desecación (platos Petri en condiciones de laboratorio y en desecador) y de las concentraciones del fungicida (0, 0,005 0,01, 0,05 y 0,10 ppm).

Las pruebas se evaluaron en un diseño completamente al azar en un arreglo factorial $3 \times 2 \times 2 \times 2 \times 5$ que representa: las tres secuencias de descarga, las dos condiciones de humedad, los dos hospederos, las dos formas de desecado, y las cinco concentraciones del fungicida, sobre dos réplicas (cada réplica consta de 30 mediciones).

Se evaluaron los efectos principales y las interacciones de primer y segundo orden. Las separaciones de medias fueron realizadas utilizando la opción LSMEAN/PDIFF de SAS (SAS 1987).

3.4.2.- Muestras de banano de Guápiles y La Lola

Para este ensayo, se utilizó la misma metodología explicada anteriormente. Se usaron muestras de dos localidades: Guápiles y La Lola.

3.5- Resultados

3.5.1- Para el análisis de los testigos.

Los resultados que se presentan, están en función del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, con base en todos los factores estudiados, excepto el fungicida.

En la Tabla 3.1 se presenta la interacción de la secuencia de descarga de ascosporas y la especie del hospedero del que se tomó la muestra (plátano y banano), sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* de La Lola, sometidas a dos condiciones de humedad (sin y con cámara húmeda). Estos valores de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas evidencian el efecto de la cámara húmeda en la recuperación o maduración de los peritecios y que este efecto es similar para las poblaciones del patógeno de banano y plátano. En ausencia de la cámara húmeda la recuperación y/o maduración de los peritecios se reduce.

Las Figuras 3.1 y 3.2, muestran el comportamiento de ascosporas de *M. fijiensis* obtenidas de hojas de plátano y banano en función de la secuencia de descarga, sin y con el uso de la cámara húmeda, respectivamente.

Tabla 3.1 Efecto de la secuencia de descarga y del hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascoporas de *M. fijiensis* bajo dos condiciones de humedad.

Secuencia de descarga (cada 48 hr)	Hospedero	Longitud [±] (micras)
1 ^a	plátano	213,65 de
1 ^b	plátano	222,24 d
1 ^a	banano	225,12 d
1 ^b	banano	228,38 d
2 ^a	plátano	152,50 g
2 ^b	plátano	193,25 efg
2 ^a	banano	147,89 g
2 ^b	banano	217,44 de
3 ^a	plátano	172,85 fg
3 ^b	plátano	272,98 c
3 ^a	banano	182,45 fg
3 ^b	banano	297,17 c

^a Sin cámara húmeda

^b Con cámara húmeda

[±] Medias con igual letras no difieren al 5% según /PDIFF.

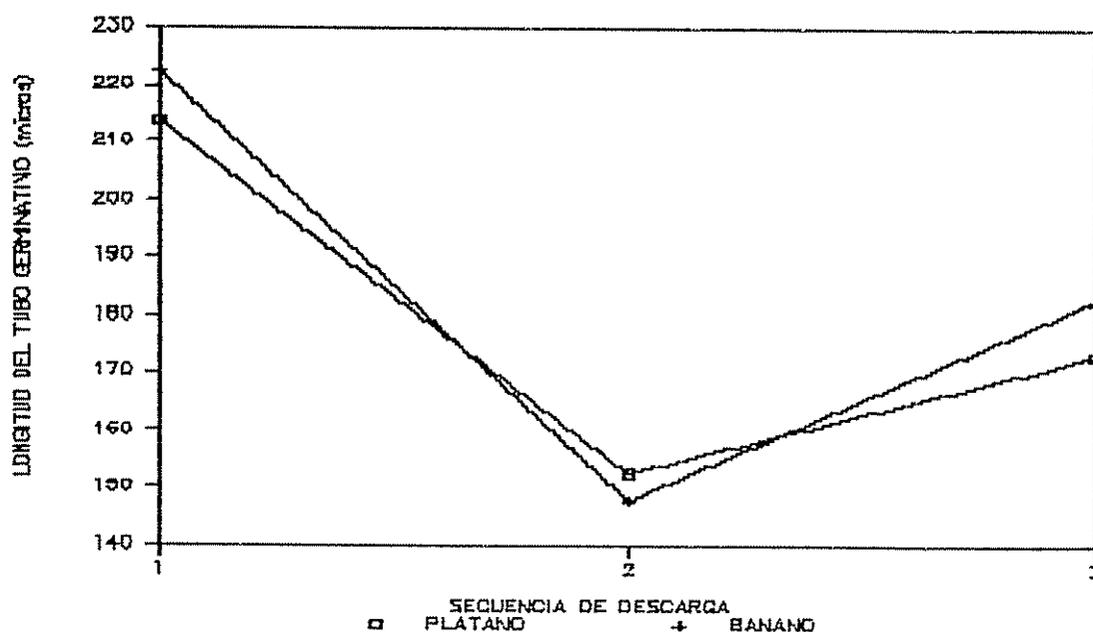


Fig 3.1 Efecto de la secuencia de descarga y hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascoporas de *M. fijiensis* sin el uso de cámara húmeda.

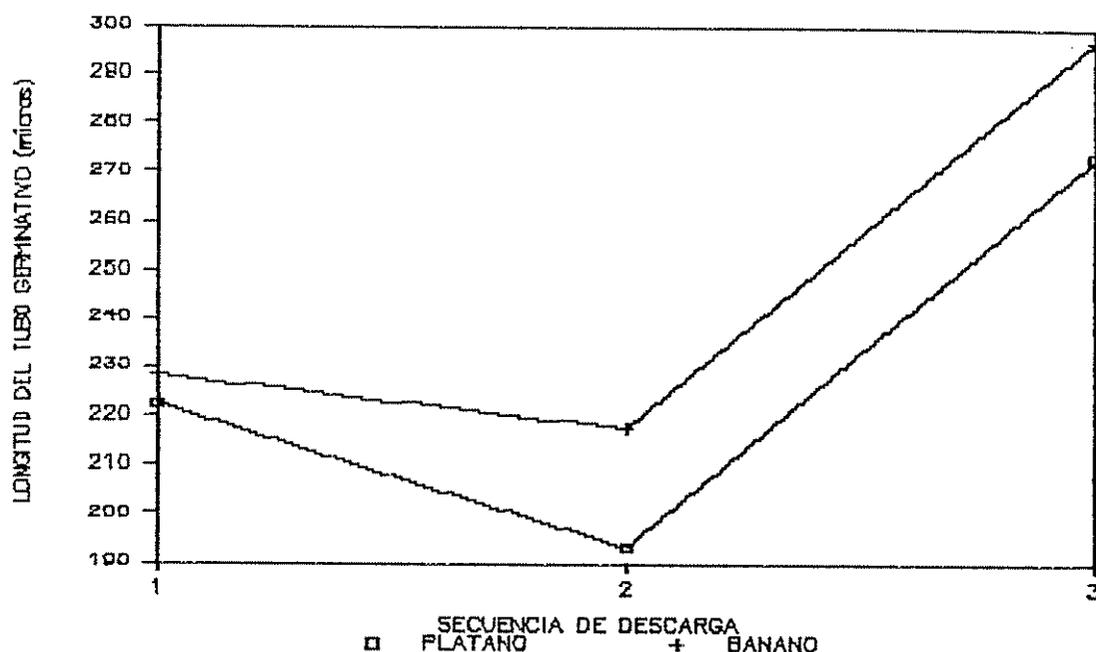


Fig 3.2 Efecto de la secuencia de descarga y hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* con el uso de cámara húmeda.

El resultado para la interacción de la secuencia de descarga de ascosporas y la localidad de procedencia (Guápiles y La Lola), sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* obtenidas de banano, se presenta en la Tabla 3.2. Nuevamente se evidencia el efecto del uso de la cámara húmeda sobre la recuperación y/o maduración de los peritecios del hongo, pero esta vez, este proceso es más largo (cuatro días); en cambio sin utilizar la cámara húmeda no se recuperan los peritecios a través de las sucesivas descargas para ambas localidades.

Tabla 3.2 Efecto de secuencia de descarga y la procedencia en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* bajo dos condiciones de humedad.

Secuencia de descarga (cada 48 hr)	Procedencia	Longitud [±] (micras)
1 ^a	Guápiles	226,61 de
1 ^b	Guápiles	235,63 d
1 ^a	La Lola	278,69 c
1 ^b	La Lola	243,84 d
2 ^a	Guápiles	154,32 fg
2 ^b	Guápiles	151,92 fg
2 ^a	La Lola	160,37 fg
2 ^b	La Lola	162,91 f
3 ^a	Guápiles	125,62 g
3 ^b	Guápiles	197,52 e
3 ^a	La Lola	129,12 fg
3 ^b	La Lola	244,66 cd

^a Sin cámara húmeda

^b Con cámara húmeda

[±] Media con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

Las Figuras 3.3 y 3.4, muestran el comportamiento de las ascosporas de *M. fijiensis* procedentes de muestras obtenidas en Guápiles y La Lola de banano en función de la secuencia de descarga, sin y con el uso de la cámara húmeda, respectivamente.

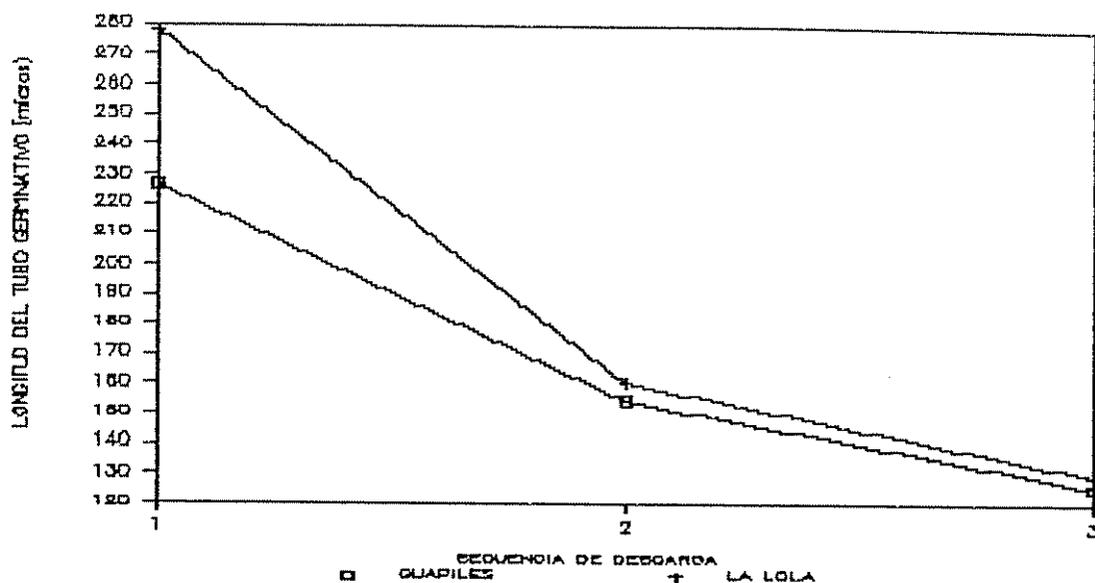


Fig 3.3 Efecto de la secuencia de descarga y la procedencia sobre la longitud del tubo germinativo de *M. fijiensis* sin el uso de cámara húmeda.

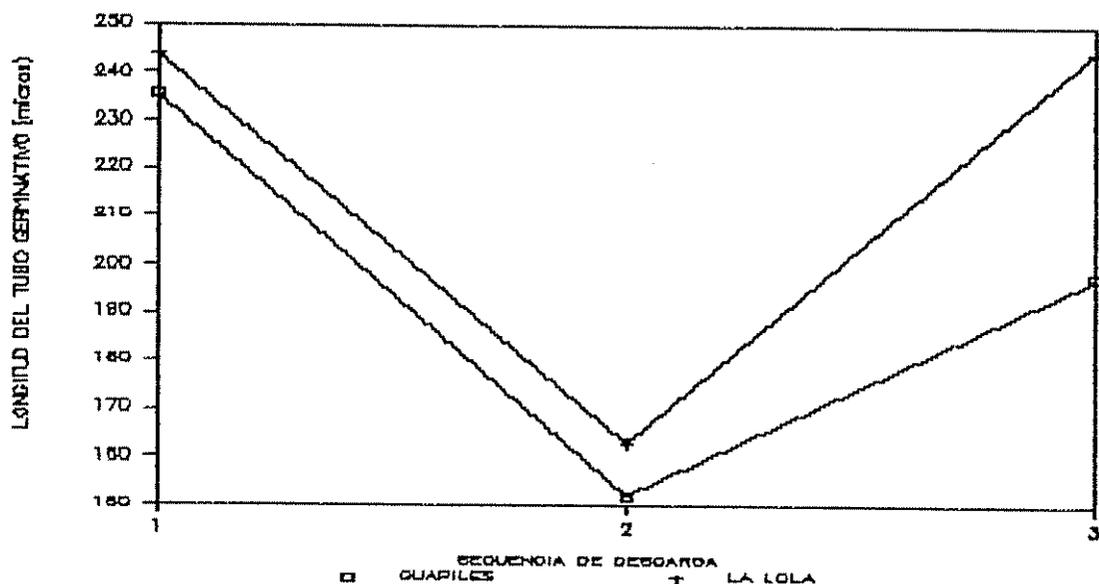


Fig 3.4 Efecto de la secuencia de descarga y la procedencia sobre la longitud del tubo germinativo de *M. fijiensis* con el uso de cámara húmeda.

En la Tabla 3.3 se presenta el resultado del efecto de la secuencia de descarga y especie de hospedero (plátano y banano) sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* de La Lola. Del examen de estos datos se observa que no existe mayor diferencia entre las poblaciones del patógeno de plátano y banano, pero sí es evidente que en ambas poblaciones hay cierto agotamiento de los peritecios luego de una descarga, así como también el hecho de que hay una recuperación de estos peritecios luego de cuatro días, independientemente del hospedero del que se toma el patógeno. También, se nota que el tubo germinativo de las ascosporas tomadas de banano es numéricamente mayor en todos los casos, que los provenientes de plátano.

La Figura 3.5, es una gráfica de los datos de la Tabla 3.3 demostrando de manera más evidente la similitud en la respuesta de ambas poblaciones del patógeno, en las distintas secuencias de descarga. Al igual que la mayor longitud de los tubos germinativos obtenidas de banano.

Tabla 3.3 Efecto de la secuencia de descarga y del hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

Secuencia de descarga	Hospedero	Longitud ¹ (micras)
1	plátano	217,94 b
1	banano	226,75 ab
2	plátano	172,87 c
2	banano	182,66 c
3	plátano	222,91 ab
3	banano	239.81 a

¹ Medias con igual letra no difieren al 5% según /FDIFF

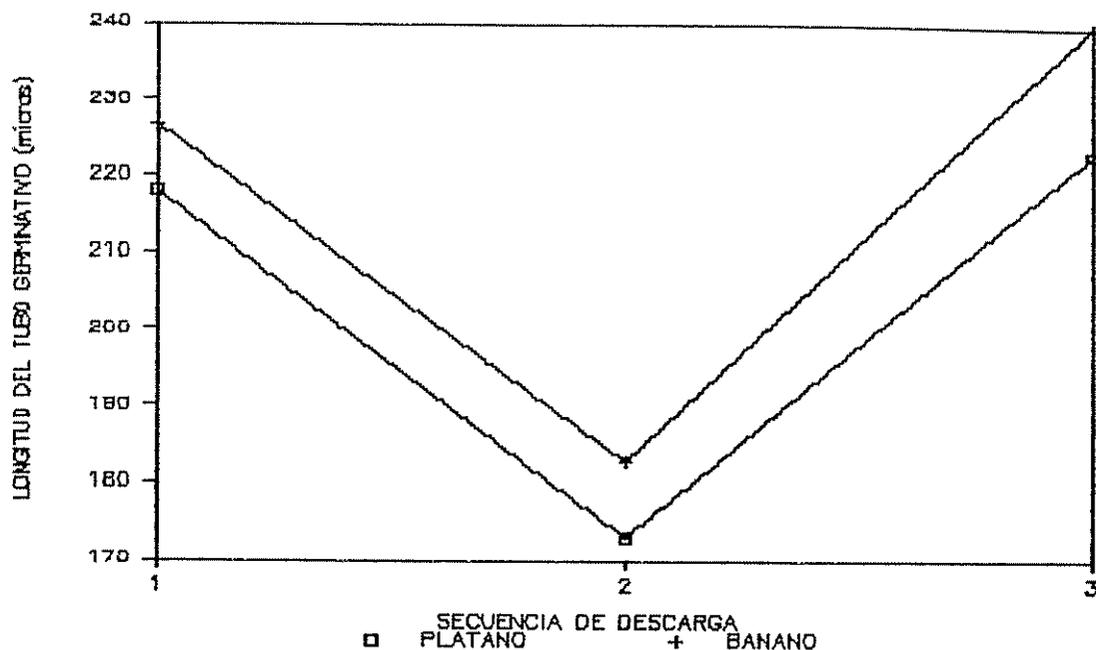


Fig 3.5 Efecto de la secuencia de descarga y hospedero sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*.

La Tabla 3.4, muestra el resultado de la interacción secuencia de descarga y localidad de procedencia (Guápiles y La Lola), sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* de banano. Estos datos no indican una recuperación marcada, de las ascosporas del hongo, aún después de cuatro días.

La Figura 3.6, es una gráfica de los datos de la Tabla 3.4, en donde se nota que luego de cuatro días hay cierta recuperación, aunque esta no es muy apreciable. Sin embargo, la población de La Lola se recupera más rápido.

Tabla 3.4 Efecto de la secuencia de descarga y de la procedencia sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*.

Secuencia de descarga	Procedencia	Longitud ¹ (micras)
1	Guápiles	231,12 b
1	La Lola	261,26 a
2	Guápiles	153,12 d
2	La Lola	161,64 d
3	Guápiles	161,57 d
3	La Lola	186,89 c

¹ Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

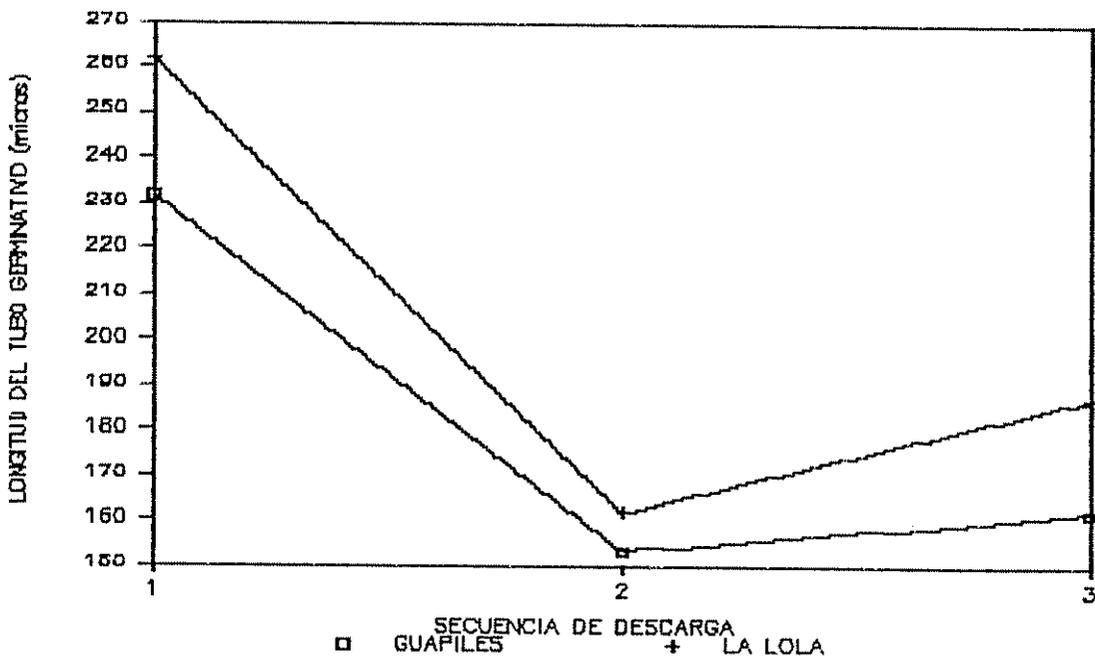


Fig 3.6 Efecto de la secuencia de descarga y de la procedencia sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*.

En la Tabla 3.5 se presenta el resultado de la interacción humedad (con y sin cámara húmeda) y especie de hospedero (plátano y banano), del que se obtuvo la población de *M. fijiensis*, de La Lola, sobre la longitud de sus tubos germinativos. En estos datos se observa el gran efecto del uso de la cámara húmeda sobre ambas poblaciones. Así como la mayor longitud del tubo germinativo de las ascosporas *M. fijiensis* tomadas de banano, utilizando la cámara húmeda.

La Figura 3.7, es una gráfica de los datos de la Tabla 3.5, en la cual se observa que el uso de la cámara húmeda aumenta la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, independientemente del hospedero, sin embargo, muestras procedentes de banano presentan una mayor respuesta que los de plátano.

Tabla 3.5 Efecto de la humedad y del hospedero en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*.

Humedad	Hospedero	Longitud ¹ (micras)
Sin cámara húmeda	plátano	179,66 c
Sin cámara húmeda	banano	185,15 c
Con cámara húmeda	plátano	229,49 b
Con cámara húmeda	banano	247,66 a

¹ Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

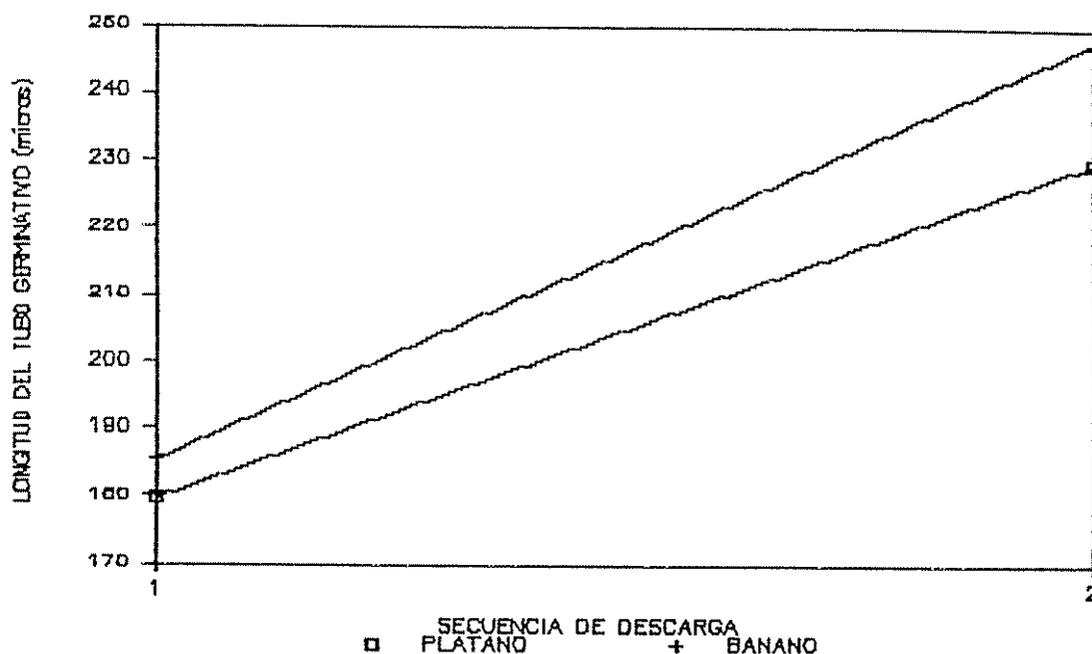


Fig.3.7 Efecto de la humedad y del hospedero en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*.

La Tabla 3.6, presenta los valores del resultado de las interacciones humedad (con y sin cámara húmeda) y localidad de procedencia (Guápiles y La Lola), sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* en banano,. Esta respuesta es similar que la presentada en la Tabla 3.5. También es evidente la mayor longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* provenientes de muestras de La Lola en ambas condiciones de humedad.

La Figura 3.8, es la gráfica de los datos de la Tabla 3.6, mostrando la marcada similitud en las respuestas de ambas poblaciones al uso o no de la cámara húmeda, es interesante observar que la recta de ambas poblaciones del patógeno presentan pendientes muy similares, evidenciando que no existe interacción entre los factores humedad y localidad de procedencia como lo indica el apéndice 3.2.

Tabla 3.6 Efecto de la humedad y de la procedencia, en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*.

Humedad	Procedencia	Longitud ¹ (micras)
Sin cámara húmeda	Guápiles	168,85 c
Sin cámara húmeda	La Lola	189,39 b
Con cámara húmeda	Guápiles	195,02 b
Con cámara húmeda	La Lola	217,14 a

¹ Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

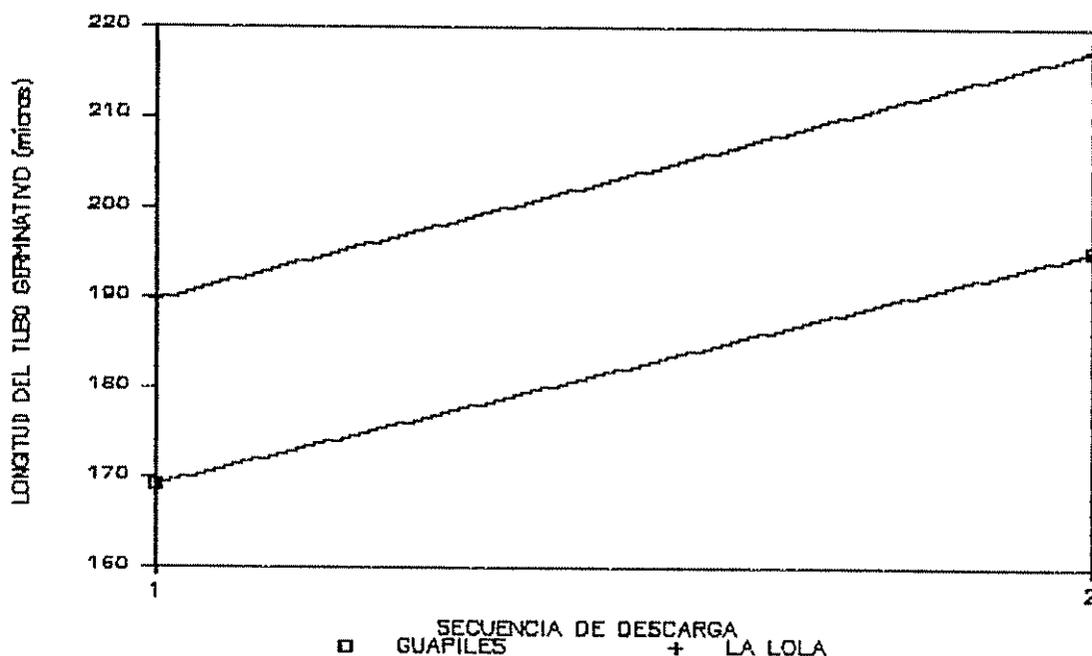


Fig 3.8 Efecto de la humedad y de la localidad en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*.

En la Tabla 3.7 se presenta el resultado de las interacciones secuencia de descarga y humedad (con y sin cámara húmeda) sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, de muestras provenientes de La Lola. Aquí se ve que el uso de la cámara húmeda promueve la maduración de las ascosporas del hongo.

Tabla 3.7 Efecto de la secuencia de descarga y de la humedad en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* de La Lola.

Secuencia de de descarga	Humedad	Longitud [±] (micras)
1	sin cámara húmeda	219,38 bc
1	con cámara húmeda	225,31 b
2	sin cámara húmeda	150,19 c
2	con cámara húmeda	205,34 c
3	sin cámara húmeda	177,65 c
3	con cámara húmeda	285,07 a

[±] Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

La figura 3.9, es una gráfica de los datos de la Tabla 3.7, en donde se demuestra la gran recuperación de los peritecios del hongo cuando se usa la cámara húmeda.

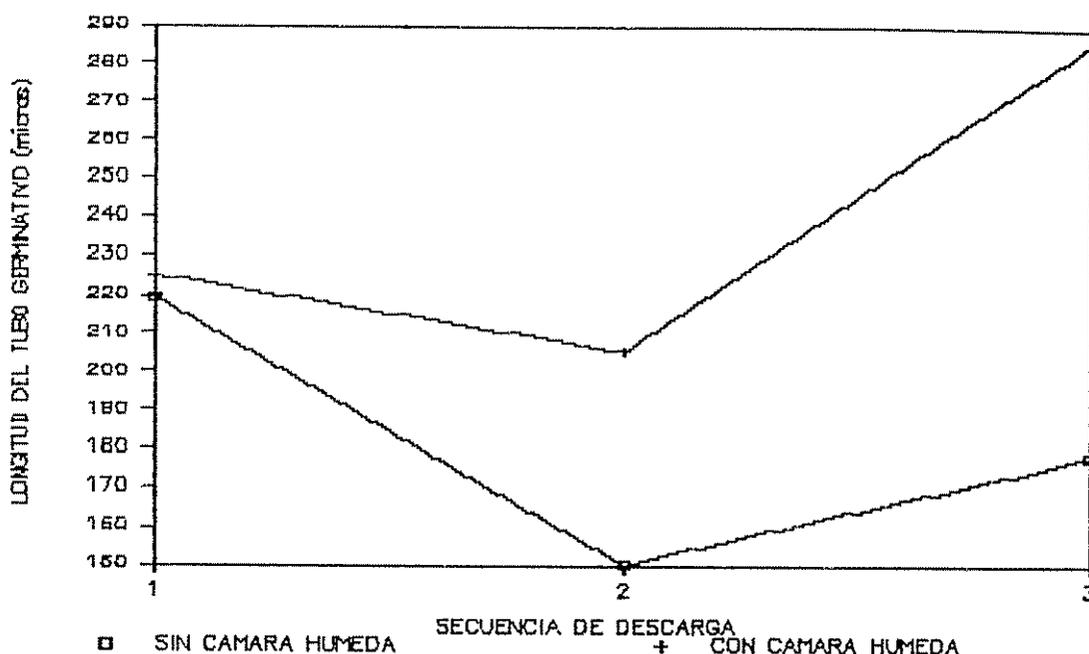


Fig 3.9 Efecto de la secuencia de descarga y de la humedad en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* procedentes de La Lola.

La Tabla 3.8, presenta el resultado de las interacciones secuencia de descarga y localidad de procedencia (Guápiles y La Lola), sobre la longitud de tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* en banano. Según los datos de esta tabla se observa que las ascosporas provenientes de las muestras que no fueron sometidas al uso de la cámara húmeda no se recuperan, contrariamente a lo que sucede con los peritecios que fueron sometidas al uso de cámara húmeda; esta es una respuesta similar a la se observada en los datos de la Tabla 3.7.

La figura 3.10, es una gráfica de los datos de la Tabla 3.8, en donde resalta el comportamiento de ambas poblaciones del hongo en general bajo las distintas secuencias de descarga y condiciones de humedad involucrados.

Tabla 3.8 Efecto de la secuencia de descarga y de la humedad en la longitud de tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* de Guápiles y La Lola.

Secuencia de de descarga	Humedad	Longitud ¹ (micras)
1	sin cámara húmeda	252,65 a
1	con cámara húmeda	239,74 bc
2	sin cámara húmeda	157,34 d
2	con cámara húmeda	157,42 d
3	sin cámara húmeda	127,37 e
3	con cámara húmeda	221,09 c

¹ Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

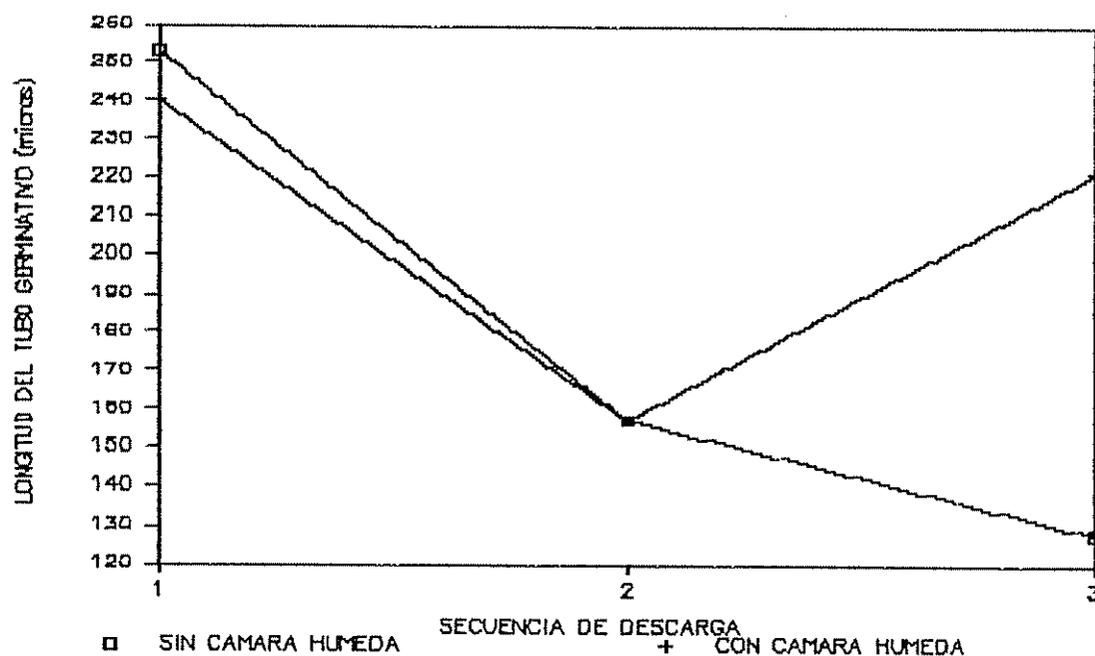


Fig 3.10 Efecto de la secuencia de descarga y de la humedad en la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* provenientes de Guápiles y La Lola.

3.5.2- De las pruebas que incluyen el efecto del fungicida.

En las Tablas 3.9 a 3.16 se presentan los resultados en función de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*. En las figuras 3.11 a 3.20 se presentan los mismos datos pero en términos de porcentaje de reducción del tubo germinativo de las ascosporas *M. fijiensis* bajo las distintas concentraciones del fungicida.

El resultado del efecto de las interacciones secuencia de descarga, humedad (sin y con cámara húmeda) y concentración del fungicida ISE (propiconazole) sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* obtenidos en las localidades de Guápiles y La Lola sobre banano, se presenta en la Tabla 3.9. Se observa que a las concentraciones superiores del fungicida, la longitud del tubo germinativo de las ascosporas son similares, independientemente de la secuencia de descarga y las condiciones de humedad a la que fueron sometidas.

Las Figuras 3.11 y 3.12 corresponden a las gráficas de los datos de la Tabla 3.9, para las condiciones de humedad, sin y con cámara húmeda, respectivamente, pero en términos de porcentaje de reducción de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*. En estas gráficas se observa que el máximo porcentaje de reducción en aquellos tratamientos que presentan tubos germinativos cortos sus testigos, es inferior que para aquellos tratamientos en que el tubo germinativo de sus testigos es largo.

Tabla 3.9 Efecto de las secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* de Guápiles y La Lola.

Secuencia	Concentración (ppm)				
	0,0 [±]	0,005	0,01	0,05	0,10
1 [▲]	252,65 a	131,74 d	91,54 ef	39,41 g	36,91 g
1 [▢]	239,74 ab	134,04 d	73,75 f	41,76 g	41,93 g
2 [▲]	157,34 c	120,05 d	90,77 ef	40,73 g	35,23 g
2 [▢]	157,42 c	122,02 d	91,94 ef	37,27 g	38,40 g
3 [▲]	127,37 d	99,53 e	76,25 f	32,02 g	34,20 g
3 [▢]	221,09 b	154,03 c	96,96 e	42,89 g	41,16 g

▲ Sin cámara húmeda

▢ Con cámara húmeda

± Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

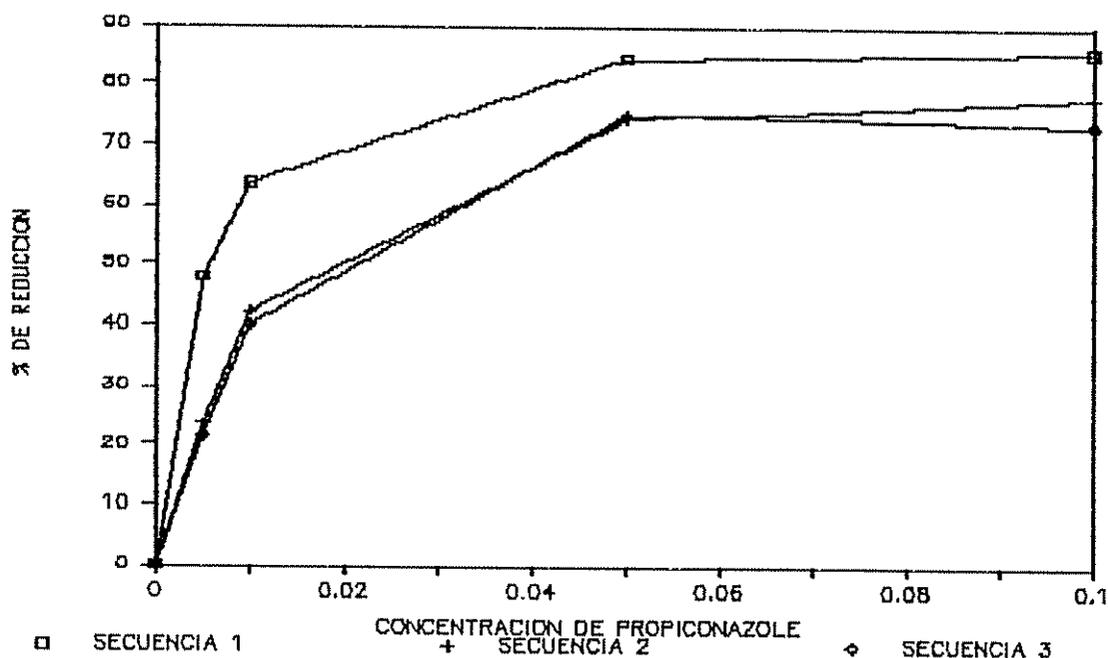


Fig 3.11 Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, sin el uso de de cámara húmeda.

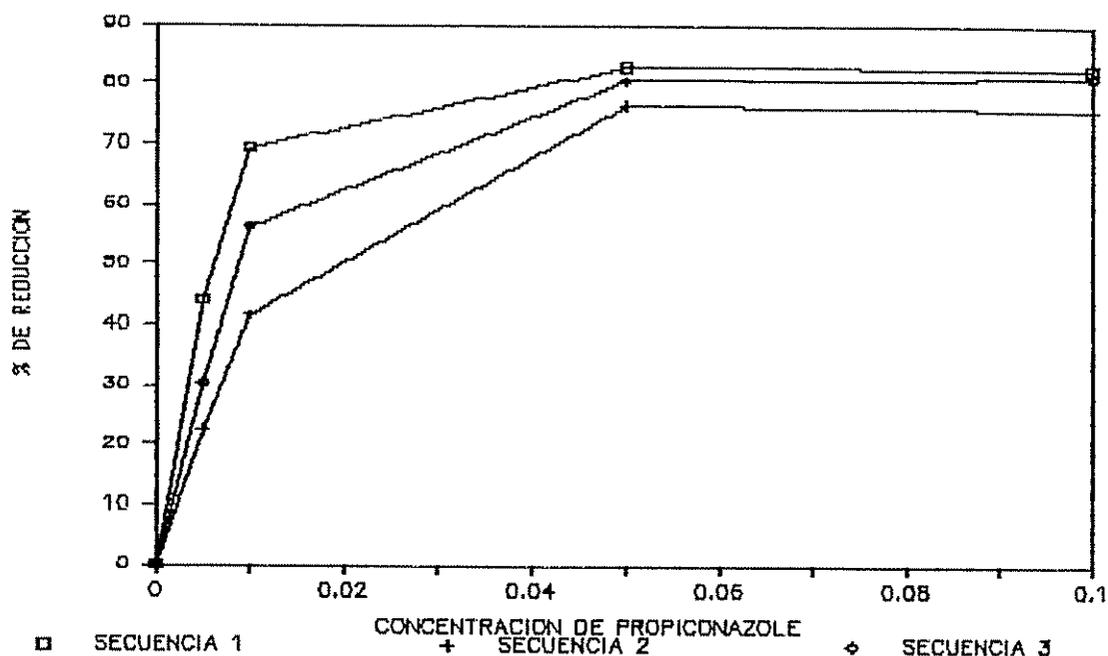


Fig 3.12 Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, con el uso de cámara húmeda.

En la Tabla 3.10 se presenta el resultado de las interacciones secuencia de descarga, humedad (sin y con cámara húmeda) concentración de propiconazole, sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, obtenidas de La Lola en banano y plátano. Nuevamente se observa la similitud en la longitud de los tubos germinativos de las ascosporas sometidas a las concentraciones superiores del fungicida.

Las Figuras 3.13 y 3.14, corresponden a las gráficas de los datos de la Tabla 3.10, para las condiciones de humedad, sin y con cámara húmeda respectivamente, pero en términos de porcentaje de reducción del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, de La Lola (en plátano y banano).

Tabla 3.10 Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole en la longitud (micras) del tubo germinativos de ascosporas de *M. fijiensis* de La Lola.

Secuencia	Concentración (ppm)				
	0,0 [±]	0,005	0,01	0,05	0,10
1*	219,38 b	153,57 ef	113,28 i	51,10 jkl	38,40 lm
1 [∨]	225,31 b	179,93 d	127,56 gh	47,40 jklm	47,93 jkl
2*	150,19 ef	106,32 i	56,81 jk	37,42 lm	29,47 m
2 [∨]	205,64 c	141,48 fg	104,38 i	44,52 klm	47,23 jklm
3*	177,65 d	154,99 ef	116,62 hi	49,34 jkl	40,63 lm
3 [∨]	285,07 a	215,57 bc	163,22 e	59,59 j	56,30 jk

* Sin cámara húmeda

[∨] Con cámara húmeda

[±] Medias con igual letra no difieren al 5% según /FDIFF

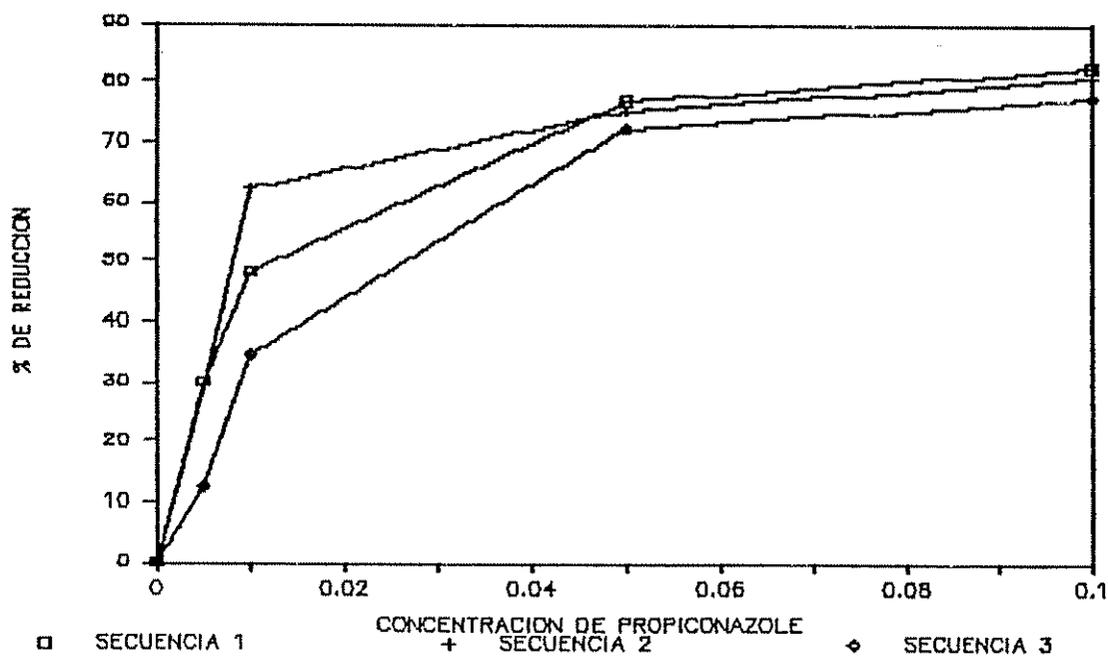


Fig 3.13 Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, sin el uso de la cámara húmeda.

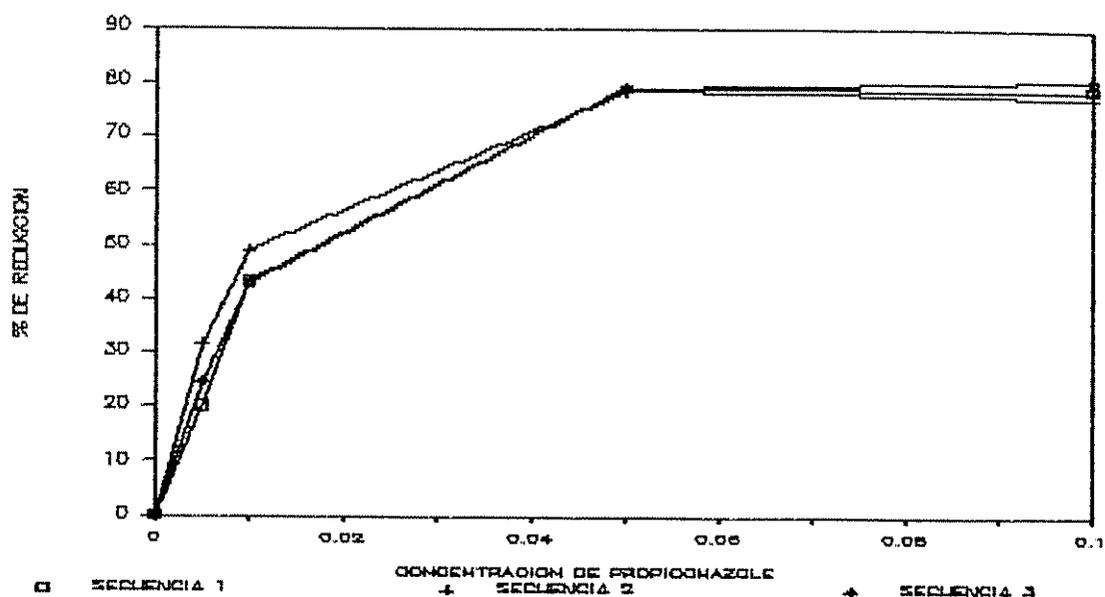


Fig 3.14 Efecto de la secuencia de descarga, humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, con el uso de la cámara húmeda.

La Tabla 3.11 presenta los datos del resultado de las interacciones secuencia de descarga y concentración de propiconazole sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* de las localidades de Guápiles y La Lola, en banano. Se observa que a las concentraciones superiores del fungicida son similares las longitudes de los tubos germinativos de las ascosporas, independientemente de la secuencia de descarga, así como también, que no existe mayor diferencia entre las dos últimas concentraciones del fungicida.

La Figura 3.15 es una gráfica de los datos de la Tabla 3.11 en forma de porcentaje de reducción del tubo germinativo de ascosporas del hongo, de las localidades de Guápiles y La Lola, bajo cinco concentraciones de propiconazole y a tres secuencias de descarga.

Tabla 3.11 Efecto de secuencia de descarga y concentración de propiconazole, sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* de Guápiles y La Lola.

Secuencia	Concentración (ppm)				
	0,0 ¹	0,005	0,01	0,05	0,10
1	246,19 a	132,89 d	82,64 e	40,58 f	39,42 f
2	157,38 c	121,03 d	91,36 e	39,00 f	36,82 f
3	174,23 b	126,78 d	86,60 e	37,45 f	37,68 f

¹ Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

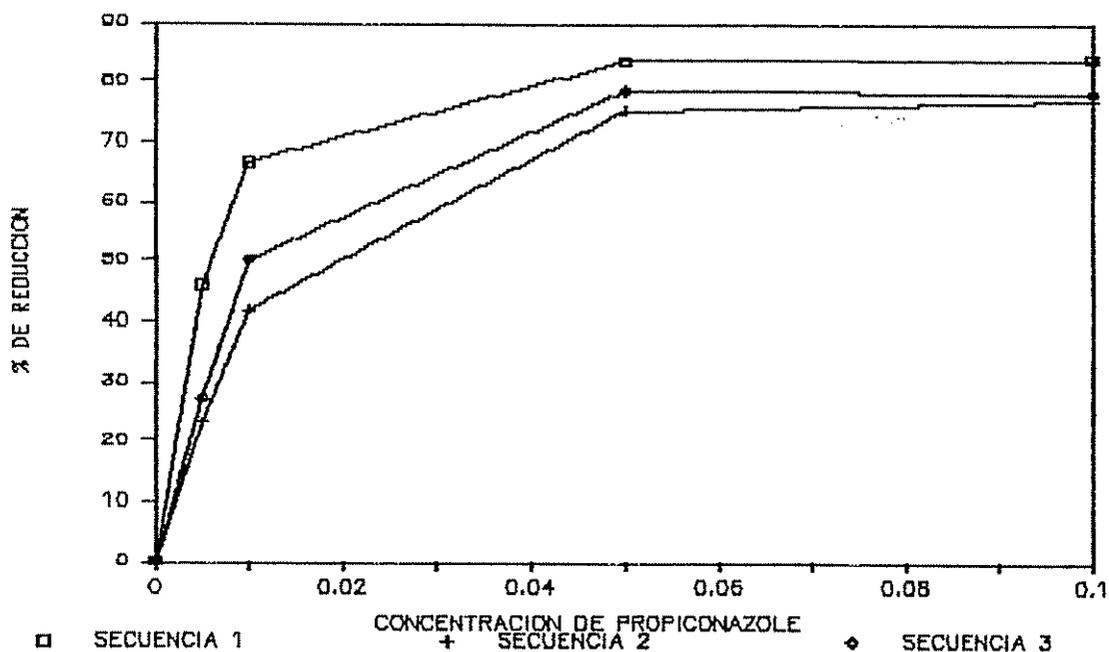


Fig 3.15 Efecto de la secuencia de descarga y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de Guápiles y La Lola.

Los valores del efecto de las interacciones secuencia de descarga y concentración de propiconazole, sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, en plátano y banano de la localidad de La Lola, se presentan en

la Tabla 3.12. De nuevo se evidencia el hecho de que no existe mayor diferencia entre las dos últimas concentraciones del fungicida.

La Figura 3.16, corresponde a la gráfica de los datos de la Tabla 3.12. Pero en términos de porcentaje de reducción de los tubos germinativos de las ascosporas de *M. fijiensis*, en plátano y banano de la localidad de La Lola, sometidas a tres secuencias de descarga y cinco concentraciones del fungicida propiconazole, demostrando que independientemente de las secuencias de descarga, las dos últimas concentraciones del fungicida logran un porcentaje de reducción similar.

Tabla 3.12 Efecto de secuencia de descarga y concentración de propiconazole, sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* de La Lola.

Secuencia	Concentración (ppm)				
	0,0 ¹	0,005	0,01	0,05	0,10
1	222,35 a	166,75 c	120,42 e	49,25 gh	43,16 h
2	177,77 b	123,90 e	80,59 f	40,97 h	38,35 h
3	231,36 a	185,28 b	139,92 d	54,47 g	48,47 g

¹ Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

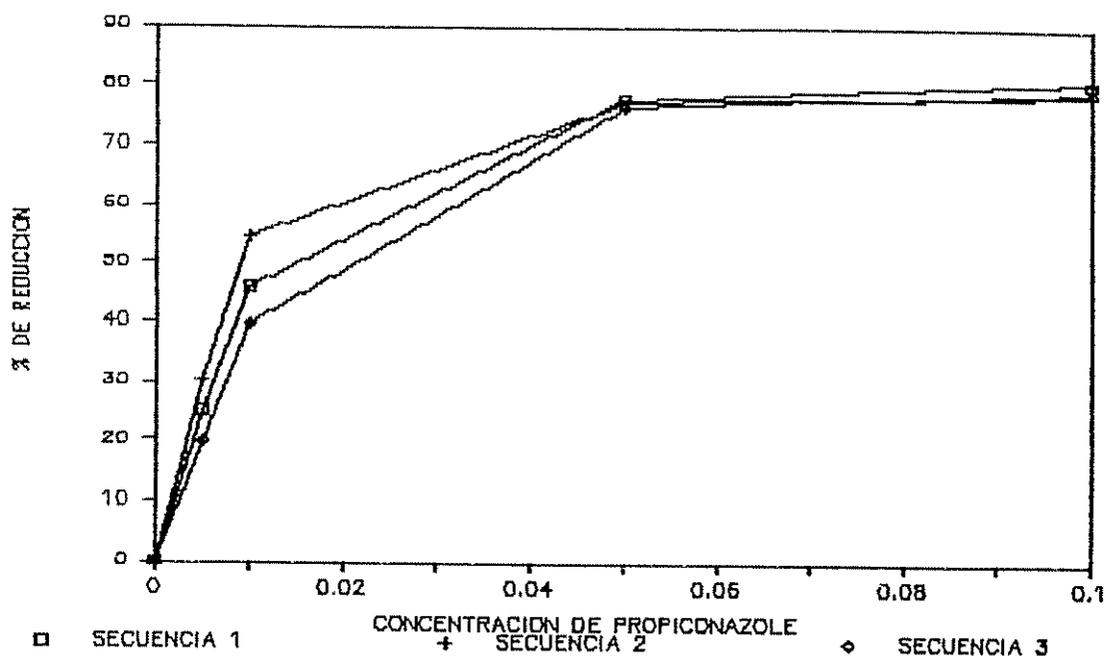


Fig 3.16 Efecto de la secuencia de descarga y concentración de propiconazole en la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de La Lola.

La Tabla 3.13, presenta el resultado de las interacciones humedad (sin y con cámara húmeda) y concentración (ppm) del fungicida propiconazole, sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, de banano en las localidades de Guápiles y La Lola. Nuevamente se observa que a las concentraciones superiores del fungicida, hay similitud en la longitud de los tubos germinativos, independientemente de las condiciones de humedad, también es evidente la similitud del efecto de las dos últimas concentraciones del fungicida.

Tabla 3.13 Efecto de la humedad y concentración de propiconazole, sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de Guápiles y La Lola.

Humedad	Concentración (ppm)				
	0,0 ¹	0,005	0,01	0,05	0,10
Sin cámara	179,12 b	117,10 d	86,18 e	37,38 f	35,45 f
Con cámara	206,08 a	136,70 c	87,55 e	40,64 f	40,50 f

¹ Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF

La Figura 3.17, corresponde a la gráfica de los datos de la Tabla 3.13, en términos de porcentaje de reducción del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, en banano de las localidades de Guápiles y La Lola sometidas a dos condiciones de humedad y cinco concentraciones de propiconazole. De esta gráfica se evidencia el hecho de que para los tratamientos en que los testigos presentan una mayor longitud de sus tubos germinativos, corresponde un mayor porcentaje de reducción.

La Tabla 3.14, presenta el resultado de las interacciones humedad (sin y con cámara húmeda) y concentraciones del fungicida propiconazole, sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, de La Lola. De los datos de esta Tabla se observa que se plantea una situación semejante que la presentada en los datos de la Tabla 3.13.

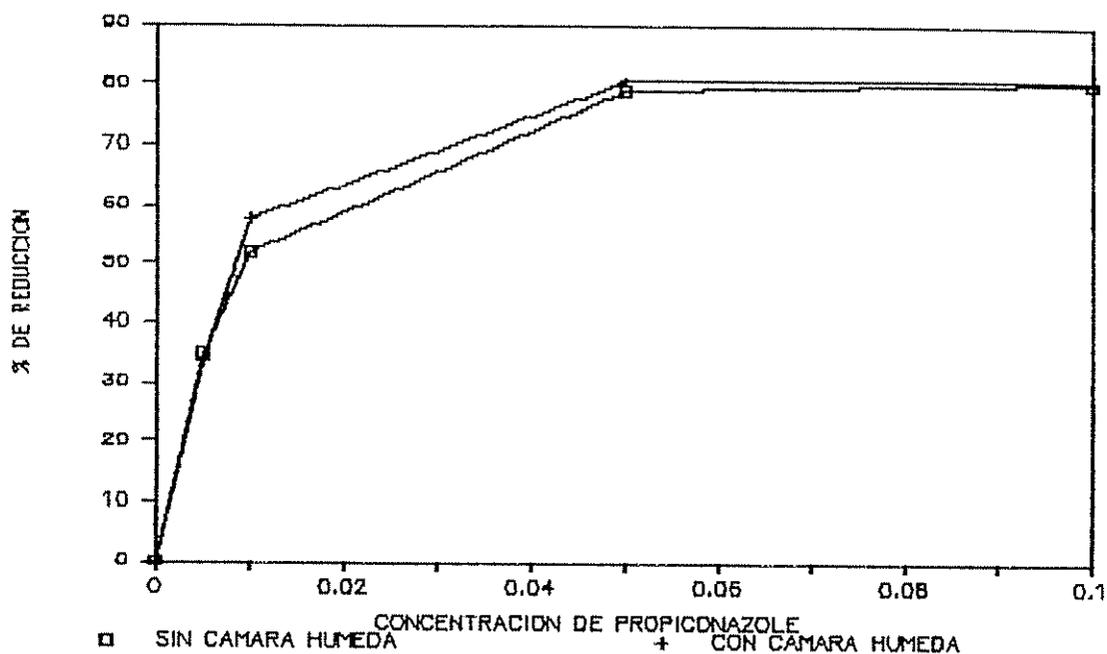


Fig 3.17 Efecto de la humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de Guápiles y La Lola.

Tabla 3.14 Efecto de la humedad y concentración de propiconazole, en la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* de La Lola.

Humedad	Concentración (ppm)				
	0,0 [±]	0,005	0,01	0,05	0,10
Sin cámara	182,41 b	138,30 c	95,57 d	45,95 e	36,17 f
Con cámara	238,58 a	178,99 b	131,72 c	50,50 e	50,49 e

[±] Medias con igual letra no difieren al 5% según /PDIFF.

La Figura 3.18, corresponde a la gráfica de los datos de la Tabla 3.14, pero en términos de porcentaje de reducción del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*.

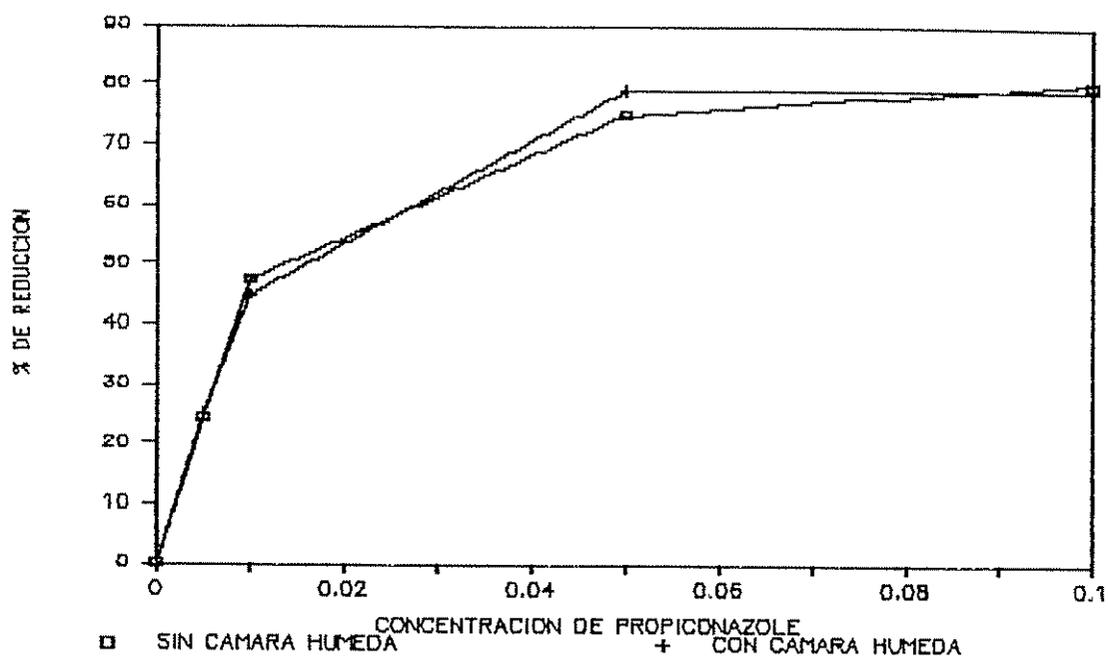


Fig 3.18 Efecto de la humedad y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de La Lola.

La Tabla 3.15, muestra el resultado de las interacciones de hospedero (plátano y banano) y concentración del fungicida propiconazole, sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* de la localidad de La Lola. Es interesante observar que no existe mayor diferencia en la respuesta de ambas poblaciones del patógeno al fungicida independientemente de la longitud del tubo germinativo de los testigos. También se mantiene el hecho de que a concentraciones superiores del fungicida hay similitud en la longitud de los tubos germinativos para ambas poblaciones, así como el hecho de la similitud en el efecto de las dos últimas concentraciones del fungicida.

Tabla 3.15 Efecto del hospedero y concentración de propiconazole sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* de La Lola.

Hospedero	Concentración (ppm)				
	0,0 ¹	0,005	0,01	0,05	0,10
Plátano	204,58 b	159,57 c	113,04 d	49,95 e	44,60 e
Banano	216,41 a	157,72 c	114,25 d	46,50 e	42,06 e

¹ Medias con igual letra no difieren al 5% según /FDIFF.

La Figura 3.19, corresponde a la gráfica de los datos de la Tabla 3.15, en términos de porcentaje de reducción del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, de la localidad de La Lola. En esta gráfica se evidencia con claridad en hecho de que para testigos con mayor longitud de tubo germinativo, se logra un mayor porcentaje de reducción.

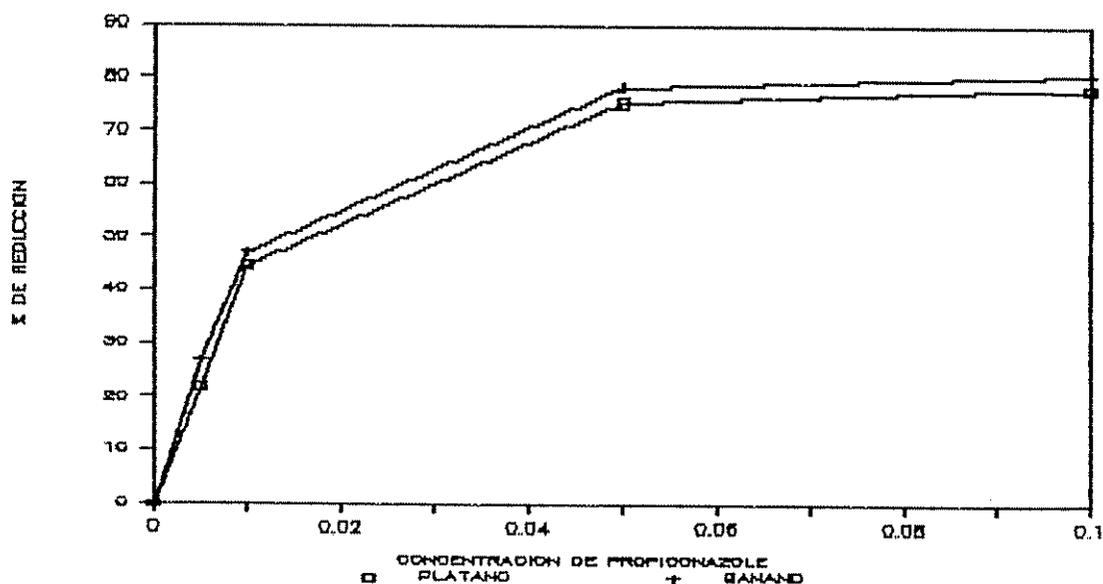


Fig 3.19 Efecto del hospedero y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de La Lola.

La Tabla 3.16, presenta los valores del resultado de las interacciones localidad de procedencia de las muestras (Guápiles y La Lola) y concentración del fungicida propiconazole, sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, tomados de banano. En la misma se nota el efecto similar de las dos últimas concentraciones sobre la longitud de los tubos germinativos, igualmente no señala mayor diferencia entre la longitud de los tubos germinativos entre las dos localidades excepto para los testigos.

La Figura 3.20, es una gráfica de los datos de la Tabla 3.16, pero en términos de porcentaje de reducción del tubo germinativo de las ascosporas para ambas localidades.

Tabla 3.16 Efecto de la procedencia y concentración de propiconazole sobre la longitud (micras) del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* de Guápiles y La Lola.

Localidad	Concentración (ppm)				
	0,0 [±]	0,005	0,01	0,05	0,10
Guápiles	181,96 b	126,46 c	80,09 e	38,18 f	37,34 f
La Lola	203,26 a	127,24 c	93,35 d	39,88 f	38,87 f

[±] Medias con igual letra no difieren al 5% según PDIFF.

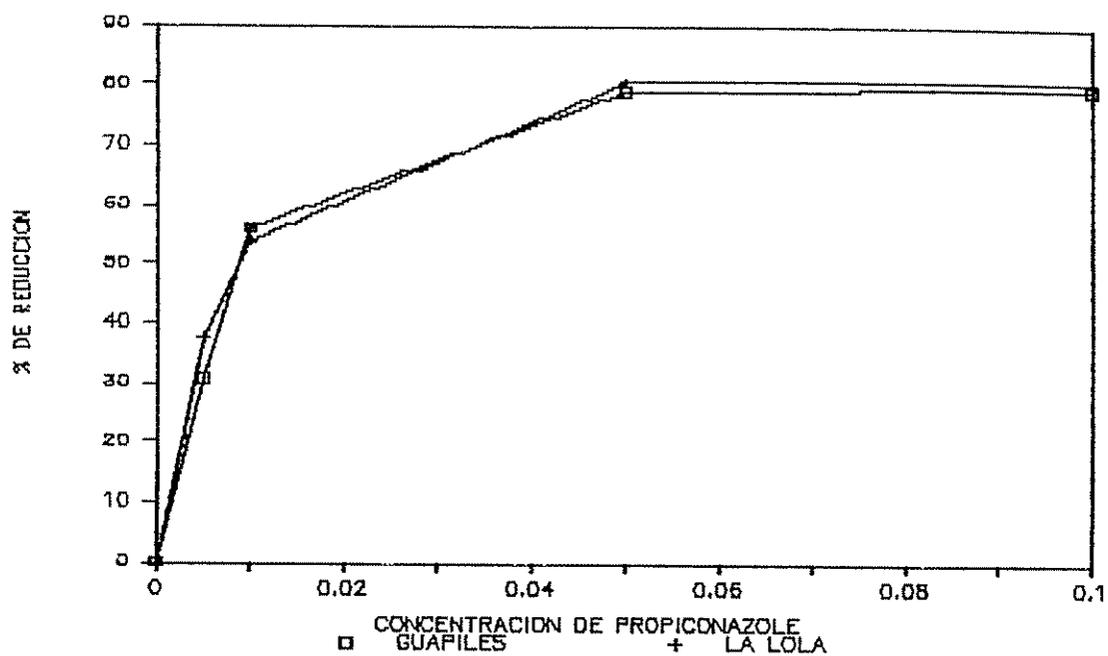


Fig 3.20 Efecto de la procedencia y concentración de propiconazole sobre la reducción de la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de Guápiles y La Lola.

3.6- Discusión

3.6.1- Efecto de la secuencia de descarga sobre la longitud del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

El efecto de la secuencia de descarga es altamente significativa en el comportamiento del hongo, tanto para la longitud de los tubos germinativos de los testigos, como para aquellas situaciones en la que se somete el hongo al fungicida. Con base en esto se infiere también que la maduración de las ascosporas del hongo no es uniforme dentro de sus peritecios tal como lo señalan Hirst y Stedman (1962) para *Venturia inaequalis*, igualmente el proceso de recuperación o maduración de las ascosporas luego de una primera descarga es de 96 horas aproximadamente; aunque según SIGATOKA NEGRA..., (1982) este período es de 48 a 72 horas.

Otro factor que se infiere del efecto de la fecha de descarga (secuencialmente), es que al descargar ascosporas inmaduras éstas tienen menor capacidad de germinación y cuando germinan, sus tubos germinativos no se desarrollan óptimamente siendo más cortos tal como lo evidenció Burget (1934). Este factor afectará la determinación del porcentaje de reducción del tubo germinación con respecto al testigo, porque llegarán más pronto al punto de saturación en relación a su respuesta al fungicida.

También, es necesario considerar si en las muestras que se toman, hay abundante peritecios recién descargados, como lo que sucedería después de una lluvia, tal como es señalado por SIGATOKA NEGRA..., (1982); porque esto influiría al momento de establecer algún parámetro de monitoreo de resistencia.

3.6.2- Efecto de la humedad

Este factor afecta significativamente la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, porque sin el uso de la cámara húmeda, los tubos germinativos son más cortos debido a que contribuye a propiciar las condiciones para la maduración de las ascosporas en forma más uniforme, también ocurre la recuperación de los peritecios luego de una descarga de manera más rápida, acortando el período de recuperación (menos de 96 horas), este rango se acerca más a la citada por SIGATOKA NEGRA..., (1982) que es de 48 a 72 horas. También permite una mayor seguridad de descarga de ascosporas de las muestras facilitando el uso de un menor número de repeticiones o secciones de tejido para las pruebas, todo esto es coincidente con lo señalado por SIGATOKA NEGRA..., (1982).

3.6.3- Efecto del Hospedero

Este factor no afectó marcadamente la longitud del tubo germinativo de las ascosporas *M. fijiensis*, (Apéndice 1A y 3A), indicando que no existe una clara diferencia en las poblaciones del patógeno que se encuentran sobre banano y plátano. Aunque es importante notar que los tubos germinativos de las ascosporas provenientes, de muestras, de banano fueron siempre más largos que los obtenidos de plátano. Estos resultados contradicen los que se obtuvieron en el Capítulo 2 de esta Tesis, porque allí la población del patógeno obtenido en plátano de La Lola poseía tubos germinativos más largos, afirmando la gran variabilidad dentro y entre poblaciones del hongo, como lo indica Molina y Salas (1989).

3.6.4- Efecto de Tipo de Desechado

Este factor tampoco afectó grandemente la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, solo

cuando se analizó los datos de los testigos procedentes de las dos localidades (Apéndice 2A) tuvo un efecto significativo sobre la longitud de los tubos germinativos de estas poblaciones del patógeno. Aunque es interesante considerar, en términos generales, que el efecto de someter las muestras en un desecador por una semana sea igual a aquella que se obtiene al colocar las muestras en un plato Petri a condiciones de laboratorio.

Cabe también señalar que aunque no hubo diferencia significativa entre los niveles de este factor, para todos los análisis efectuados; generalmente la longitud del tubo germinativo era menor para aquellas muestras en el desecador.

Talvez el efecto de desecación no diferió significativamente a los niveles estudiados, debido al tamaño de las secciones de tejido (13 mm), que lo hacía muy propenso a la desecación.

3.6.5- Efecto del Fungicida

Este factor afectó la longitud del tubo germinativo y no se discute su efecto individual, dado los objetivos del ensayo. Aunque cabe señalar que su efecto sobre el patógeno, independientemente de los otros factores involucrados, para las dos últimas concentraciones generalmente eran similares evidenciando el efecto de saturación en la respuesta del patógeno a concentraciones relativamente bajas de este fungicida ISE, tal como se evidenció en el Capítulo 2 de esta Tesis.

3.6.6- Efecto de la Localidad

El factor localidad demuestra ser altamente significativo para el comportamiento del patógeno, según los Apéndices 2A y 4A. Sin embargo no se pudo diferenciar, siempre, la población del patógeno en ambas localidades en todos los casos involucrados por las interacciones que se

presentan con los otros factores. A pesar de eso el tubo germinativo de la localidad de La Lola fue más largo; tal como se evidenció en el Capítulo 2 de esta Tesis, indicando quizás, que en ausencia del fungicida prospera mejor la población de La Lola porque la mayor longitud del tubo germinativo está dada en función del testigo. Aunque si esto fuera totalmente cierto el efecto de las distintas concentraciones del fungicida, excepto el testigo, sobre los tubos germinativos de La Lola sería mayores que para los de Guápiles. También habría un mayor porcentaje de reducción en la población de La Lola cosa que no es muy evidente en función de los resultados obtenidos.

3.6.7- Efecto de las Interacciones

Se discutirán únicamente las interacciones de primer y segundo orden, que fueron significativos (Apéndice 1A, 2A, 3A y 4A).

Se mostró con base en los resultados de ambos ensayos que el efecto conjunto de secuencia de descarga y humedad afectan significativamente la longitud del tubo germinativo. Esto se evidencia por el hecho de que en ausencia de cámara húmeda no existe mayor diferencia entre la segunda y tercera descarga, pero cuando se utiliza, entonces la longitud del tubo germinativo de la tercera descarga es incluso superior al de la primera descarga, la única excepción fue para la población de Guápiles, que a pesar de ser superior a la segunda descarga, no lo fue para la primera.

Esta interacción, biológicamente, tiene sentido si pensamos que la cámara húmeda propicia la recuperación de los peritecios después de su primera descarga, como lo encontraron Gilpatrick *et al.* (1972) para *Venturia inaequalis*. Incluso fomenta la maduración de las ascosporas jóvenes, tal como es señalado por SIGATOKA NEGRA..., (1982).

El efecto conjunto de secuencia de descarga y fungicida afecta significativamente la longitud del tubo germinativo para ambos ensayos. La explicación a esto se encuentra en el hecho de que para cada secuencia de descarga habrá unas ascosporas con diferente grado de maduración, esto lo señalan Hirst y Stedman (1962) para *V. inaequalis*, lo cual directamente influye en la longitud de su tubo germinativo como lo señala Burget (1934) para *Phyllosticta solitaria*, esto es más que nada para los testigos, pero el efecto del fungicida tiende a uniformar las longitudes de los tubos germinativos en cada secuencia; esto se observó en los resultados de este ensayo y en el resultado obtenido en el Capítulo 2 de esta Tesis. Debido al tipo de respuesta, de saturación, que se tiene a este tipo de fungicida.

El efecto conjunto de humedad y fungicida es similar al de secuencia de descarga y fungicida, ya que en ausencia de la cámara húmeda la madurez de las ascosporas es menos homogénea que al utilizarla lo cual se refleja en la longitud de los tubos germinativos de las ascosporas. Los tubos germinativos en ausencia de cámara húmeda son más cortas por consiguiente el máximo porcentaje de inhibición llega más pronto o sea que es menor.

El efecto conjunto de los factores hospederos y fungicida es significativo en la longitud del tubo germinativo de las ascosporas del hongo ya que para una misma concentración del fungicida se obtienen tubos germinativos del patógeno de plátano, más largas que los de banano a pesar de que para el testigo el tubo germinativo de las ascosporas obtenidos de banano son más largas. Aunque en términos de porcentaje de reducción no se observa ninguna interacción entre estos dos factores.

La única interacción de tercer orden que resultó significativo para la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, en ambos ensayos (Apéndice 3A y

4A) fue el efecto conjunto de secuencia de descarga, humedad y fungicida.

Este resultado es muy importante desde un punto de vista de aplicación práctica, porque indica con mayor precisión la mejor combinación de estos factores para el método a usarse.

El efecto individual del factor secuencia arroja dos secuencias de descarga, importantes, de acuerdo a los dos ensayos: primer y tercera secuencia de descarga. En función del tiempo sería más adecuado utilizar la primera descarga en el método.

El efecto individual del uso o no de la cámara húmeda a todas luces indica que es mejor utilizarla, y que también contribuye a disminuir el número de repeticiones porque asegura la maduración y descarga de ascosporas en un mayor número de peritecios, al igual que tiende a garantizar tubos germinativos más largos.

El efecto individual del fungicida indica que solo existe cuatro concentraciones diferentes del fungicida por lo que el uso de una concentración mayor que 0.05 no afecta sensiblemente la longitud del tubo germinativo lo cual sugiere el uso de concentraciones del fungicida entre 0 y 0.05 ppm, coincidiendo con las recomendaciones dadas por INIBAP (1989).

3.7- Conclusiones

A partir del resultado de esta prueba se puede concluir lo siguiente:

- 1- El uso de la cámara húmeda promueve la maduración de las ascosporas de *M. fijiensis*, así como también tiende a que los tubos germinativos de sus ascosporas sean más largos.
- 2- La longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, de la localidad de La Lola es mayor que los procedentes de Guápiles, e incluso demuestran tener mayor recuperación después de la secuencia de descarga. Aunque en términos del efecto del fungicida sobre la población de ambas localidades no se evidenció mayor diferencia entre ellas.
- 3- La maduración de las ascosporas de *M. fijiensis*, en presencia de una cámara húmeda tiende a ser efectivo en aproximadamente 96 horas.
- 4- El efecto de las concentraciones, de propiconazole, entre 0,05 y 0,10 ppm sobre todas las poblaciones del patógeno estudiados no difiere, indicando que a 0,05 ppm casi se logra la máxima reducción del tubo germinativo de las ascosporas de las poblaciones de *M. fijiensis*.

3.8. Recomendaciones

Con base en los resultados obtenidos se puede hacer las siguiente recomendaciones:

- 1- Toda vez que se vaya a realizar trabajos de monitoreo de resistencia en *M. fijiensis* a los fungicidas ISE, se debe utilizar la cámara húmeda como lo recomienda la FRAC.
- 2- En caso de que llueva, tratar de tomar las muestras al menos dos o tres días después, para darle tiempo a que las ascosporas maduren, como lo recomienda SIGATOKA NEGRA..., (1982).

- 3- Procurar no almacenar trozos de muestras muy pequeñas, bajo condiciones de laboratorio ya que son muy propensos a la desecación.
- 4- Realizar estudios bajo diferentes condiciones de humedad en el campo para ver su influencia sobre la descarga y maduración de las ascosporas.
- 5- Es muy importante realizar estudios de caracterización de las poblaciones para ver si existen diferencias a nivel de biotipos de *M. fijiensis*, para diferentes localidades.
- 6- Realizar estudios del proceso infectivo del hongo sobre sus hospederos, así como determinar en términos de infectividad ¿qué representa los distintos niveles de porcentaje de reducción de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas del hongo?

BIBLIOGRAFIA

- ARNESON, P. 1988. Principios para modelar sistemas de manejo integrado de plagas. Curso del Programa de Estudios de Posgrado del CATIE. (1988, Turrialba, C. R.).
- BERGER, R.D. and HANSON, E.W. 1963. Relation of environmental factors to growth and sporulation of *Cercospora zebrina*. *Phytopathology* (EE.UU.) 53:286-294.
- BÜCHEL, K.H. 1982. Evolution of crop protection chemicals as exemplified by fungicides. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer* (Alemania) 35(1):1-35.
- BUCHENAUER, H, & HELLWALD, K.H. 1985. Resistance of *Erysiphe graminis* on barley and wheat to sterol C-14 demethylation inhibitors. *EPPO Bulletin* (U.K.) 15:459-466.
- BUREAU, E. et al. 1982. Les cercosporioses du bananier et leurs traitements: Evolution des populations pathogenes. *Fruits* (Francia) 37(11):665-672.
- BURGET, IRMA. 1934. Some factors influencing germination of spores of *Phyllosticta solitaria*. *Phytopathology* (EE.UU.) 24:384-396.
- CALPOUZOS LUCAS. 1965. Sporulation of *Cercospora beticola* affected by an interaction between light and temperature. *Phytopathology* (EE.UU.) 55:1370-1371.
- CALPOUZOS, L. and STALLKNECHT, G.F. 1967. Effects of light on sporulation of *Cercospora beticola*. *Phytopathology* (EE.UU) 57:679-681.
- DE WAARD, M.A. 1986. Fungicide which inhibit sterol biosynthesis. 1- Introduction and overview of laboratory studies. In *International Workshop in Fungicide Resistance in Crop Protection for Latin America* San Jose (C.R.) 7 p
- DEKKER, J. 1976. Acquired resistance to fungicides. *Ann. Rev. Phytopathol* (EE.UU.) 14:405-428.
- DEKKER, J. 1985. The fungicide resistance problem: Will it grow worse? *EPPO Bulletin* (U.K.) 15(3):337-344.
- DEKKER, J. 1986a. Development of resistance in the field. In *Fungicide resistance in crop protection international workshop for Latin America*. San Jose(C.R.) 4 p.

- DEKKER, J. 1986b. Emergence of resistance in pathogen populations, historical and biological perspectives. In Fungicide resistance in crop protection workshop for Latin America. San Jose (C.R.) 4 p.
- DELP, J.C. and DEKKER, J. 1985. Fungicide resistanci: definitions and use of terms. EPPO Bulletin (U.K.) 15(3):333-335.
- FOURE, E. *et al.* 1988. La cercosporiose noire des bananierrrs et des plantains au Cameroun (*Mycosphaerella fijiensis*), Contribution a l'étude des premieres phases de l'infection parasitaire. Mise au point de tests précoces d'inoculation sur plants issus de vitro-culture. Fruits (Francia) 43(6):339-348.
- FUCHS, A. 1982. Resistance to ergosterol-biosynthesis inhibitors 1. Chemistry and phenomenological aspects. In Fungicide resistance in crop protection. Ed. J. Dekker and S.G. Georgopoulos. p. 71-86.
- FULLERTON, R.A. and TRACEY, G.M. 1984. Tolerance of *Mycosphaerella fijiensis* to benomyl and carbendazin in the Pacific Islands. Trop. Agric. (Trinidad) 61(2):133-136.
- FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). 1988. Special Report: Use of DMI-Fungicide in Banana. FRAC/IRAC. Newsletter No.2 p.12-16.
- FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). 1989. Newsletter No.12 39 p.
- GEORGOPOULOS, S.G. 1982. Detection and measurement of fungicide resistance. In Fungicide resistance in crop protection. Ed. J.Dekker and S.G.Georopoulos p. 24-31.
- GEORGOPOULOS, S.G. 1986. Genetic and biochemical basis of resistance. In Fungicide resistance in crop protection workshop for Latin America. San Jose (C.R.), 3 p.
- GEORGOPOULOS, S.G. and SKYLAKAKIS, G. 1986. Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. Crop Protection 5(5):299-305.
- GILPATRICK, J.D.; SMITH, C.A. and BLOWERS, D.R. 1972. A method of collecting ascospores of *Venturia inaequalis* for spore germinations studies. Plant Disease Reporter (EE.UU.) 56(1):39-42.
- HIRST, J.M. and STEDMAN, O.J. 1962. The epidemiology of apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.), II-observations on the liberation of ascospores. Ann. Appl. Biol. (EE.UU.) 50:525-550.

- INIBAP WORKSHOP SIGATOKA LEAF SPOT DISEASES (*MYCOSPHAERELLA* SPP) (1989, SAN JOSE, C.R.). 1989. Conclusions and recommendations from the works groups. 18 p. (mimeografiados)
- KÖLLER, W and SCHEINFFLUG, H. 1987. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: A new challenge. *Plant Disease* (EE.UU.) 71(12):1066-1074.
- MEREDITH, D.S. y LAWRENCE, J.S. 1969. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc. (U.K.)* 52(3):459-476.
- MEREDITH, D.S. y LAWRENCE, J.S. 1970. Morphology of the conidial state of *Mycosphaerella musicola* in the pacific region. *Trans. Brycol. Soc. (U.K.)* 54(2):265-281.
- MOLINA JUNIOR, A.B and SALAS, J.A 1989. Evaluation of sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* to Propiconazole. 13 p. (mimeografiado); Presentado en: INIBAP Workshop Sigatoka Leaf Spots Diseases (*Mycosphaerella* spp). (1989, San José, C. R.)
- MOURICHON, D.P. et al. 1987. Inoculation experimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture in vitro. *Fruits* (Francia) 42(4):195-198.
- MURAKISHI, H.H., HONMA, S. and KNUTSON, R. 1960. Inoculum production and seedling evaluation of celery for resistance to *Cercospora apii*. *Phytopathology* (EE.UU.) 50:605-607.
- PARK, R.F. and KEANE, P.J. 1982. Leaf diseases of Eucalyptus associated with *Mycosphaerella* species. *Trans. of Br. Mycol. Soc. (U.K.)* 79(1):101-115.
- ROMERO, A. and MARIN, D. 1989. Observations to the sensitivity monitoring method of *Mycosphaerella fijiensis* to triazol fungicides. 11 p. (mimeografiado); Presentado en: INIBAP Workshop Sigatoka Leaf Spots Disease (*Mycosphaerella* spp). (1989, San José, C. R.)
- RUPPEL, E.G. 1971. Longevity of *Cercospora beticola* conidia under different storage conditions. *Mycologia* (Inglaterra) 63:640-641.
- SAS. 1987. Stat guide for personal computers, Version 6 edition. Cary, N.C: SAS Institute Inc., (EE.UU.) 1029 p.

- SIEGEL, M.R. 1981. Sterol-inhibiting fungicide: Effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Disease* (EE.UU.) 65(12):986-989.
- SIGATOKA NEGRA y amarilla: Técnicas mejoradas para manejo e identificación. 1982. Boletín Técnico de la Dupont (EE.UU.) E-55786 17 p.
- SKYLAKIS, G. 1982. The development and use of models describing outbreaks of resistance to fungicides. *Crop Protection* 1(3):249-262.
- SKYLAKIS, G. 1983. Theory and strategy of chemical control. *Ann. Rev. Phytopathol* (EE.UU.) 21:117-135.
- SKYLAKIS, G. 1985. Two Different processes for the selection of fungicide-resistant sub-populations. *EPPO Bulletin* (U.K.) 15:519-525
- STEEL, R.G. and TORRIE, J.H. 1985. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Trad. Ricardo Martínez. Bogotá, Col, McGRAW-HILL. 622 p.
- STEVA, H.; CLERJEAU, M. and GOMEZ, M.T. S.DA. 1989. Reduced sensitivity to triadimenol in portuguese field populations of *Uncinula necator*. In *FRAC Newsletter* No.12 p. 30-31.
- STOVER, R.H. 1969. The effect of benomyl on *Mycosphaerella musicola*. *Plant Disease Reporter* (EE.UU.) 53(10):830-833.
- STOVER, R.H. 1971. Ascospore survival in *Mycosphaerella musicola*. *Phytopathology* (EE.UU.) 61(1):139-141.
- STOVER, R.H. 1976. Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. *Trop. Agric. (Trinidad)* 53(2):111-114.
- STOVER, R.H. 1977. Extranuclear inherited resistance to Benomyl in *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Trans. Br. Mycol. Soc. (U.K.)* 68(1):122-124.
- STOVER, R.H. 1979. Field observations on Benomyl tolerance in ascospores of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Trans. Br. Mycol. Soc. (Inglaterra)* 72(3):518-519.
- STOVER, R.H. 1980. Sigatoka leaf spots of banana and plantains. *Plant Disease* (EE.UU.) 64(8):750-756.
- STOVER, R.H. 1983. Effet du Cercospora noir sur les plantains en Amerique Centrale. *Fruits (Francia)* 38(4):326-329.

- STOVER, R.H. and SIMMONDS, N.W. 1987. Bananas. 3 ed. U.k., Longman Scientific and Technical. 468 p.
- THOMPSON, G.E. 1941. Leaf-spot diseases of Poplar caused by *Septoria musiva* and *S. populicola*. Phytopathology (EE.UU.) 31:241-254.
- TUITE, J. 1969. Plant pathological methods: fungi and bacteria. Edit. Burgess publishing company. Minneapolis (EE.UU.) 239 p.
- WOLFE, M.S. 1982. Dynamics of the pathogen population in relation to fungicide resistance. In fungicide resistance in crop protection. Ed. J. Dekker and S.G. Georgopoulos p. 139-148.
- WOLFE, M.S. 1985. Dynamics of the response of barley mildew to the use of sterol synthesis inhibitors. EPPO Bulletin (U.K.) 15:451-457.

APENDICES

CAPITULO 1

1A Composición para un litro de los medios de cultivo Mycophil, Czapeck, V8 modificado y FDA.

Mycophil

extracto de proteína de soya (por digestión en papaína)	10,0 g
Dextrosa	10,0 g
agar	10,0 g
agua hasta el litro	

Czapeck

NaNO ₃	1,00 g
K ₂ HPO ₄	1,00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50 g
KCl	0,50 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
Extracto de Levadura	1,00 g
Dextrosa	30,00 g
Agar	15,00 g
Agua de Coco	10,00 ml
Agua hasta el litro	

Agar jugo V8 modificado

Jugo V8	100,00 ml
CaCO ₃	0,20 g
Agar	20,00 g
Agua hasta el litro	

FDA

200 g de trozos de papas hervidas en 800 ml de agua por 30 min., se cuela el líquido de este cocido, al líquido colado se le añade 20 g de dextrosa y 15 g de agar, agua hasta completar un litro.

2A Análisis de varianza para los datos de esporulación de *Cercospora fijiensis* bajo oscuridad continua.

Fuente	C.M.E	F Cal	Pr > F
Modelo	1,0559	6,40	0,0034
Error	0,1651		
METODO		25,99	0,0006
CULTIVO		13,90	0,0010
TEMPER		8,10	0,0063
CULTIVO*TEMPER		3,85	0,0287
METODO*CULTIVO		1,50	0,2785
METODO*TEMPER		3,19	0,0771
R ² =0,9399 C.V.=30,11			

3A Análisis de varianza para los datos de esporulación de *Cercospora fijiensis* bajo iluminación alterna (12:12 hr).

Fuente	C.M.E	F Calc	Pr > F
Modelo	12,80479	14,39	0,0017
Error	0,88992		
METODO		32,21	0,0013
CULTIVO		19,93	0,0016
TEMPER		46,91	0,0002
CULTIVO*TEMPER		4,98	0,0359
METODO*CULTIVO		1,96	0,2217
METODO*TEMPER		8,00	0,0203
R ² =0,9761 C.V.=35,05			

- 4A Análisis de varianza para los datos de esporulación de *Cercospora fijiensis* bajo dos condiciones de iluminación.

Fuente	C.M.E.	F Ca1	Pr > F
Modelo	1,2220	4,12	0,0126
Error		0,2967	
ILUMINA		0,26	0,6191
METODO		22,53	0,0008
CULTIVO		17,77	0,0002
TEMPERA		1,27	0,2856
ILUMINA*METODO		0,01	0,9225
ILUMINA*CULTIVO		0,38	0,7724
ILUMINA*TEMPERA		0,05	0,8269
METODO*CULTIVO		0,55	0,6594
METODO*TEMPERA		0,07	0,7978
CULTIVO*TEMPERA		1,72	0,2262
ILUMIN*METODO*CULTIV		0,35	0,7886
$R^2=0,896362$		$C.V.=36,97293$	

CAPITULO 2

- 1A Longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, obtenidos en Guápiles, a bajas concentraciones de flusilazole.

Concentración (ppm)	Longitud (micras)	número de mediciones
0,0	177,8	138
0,0025	206,6	53
0,0050	184,7	61
0,0075	183,7	50

- 2A Valores de la concentración del fungicida (B) y del máximo porcentaje de reducción (A) del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis*, de varias fincas en Honduras, sometidas al fungicida propiconazole.

Parámetros	Valores
A	74,94
Inferior	67,49
Superior	82,39
B	0,0072
Inferior	0,0008
Superior	0,0136

(Molina y Salas 1989).

CAPITULO 3

- 1A Análisis de Varianza de los datos sin considerar el efecto de fungicida sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* de La Lola y los factores e interacciones significativos.

F.V.	C.M.	Fcal	Pr>F
MODELO	13530,203	25,37	0,0001
ERROR	533,352		
Secuencia		45,63	0,0001
Humedad		128,66	0,0001
Hospedero		5,91	0,0333
Secuen*Humed		35,11	0,0001
R ² =0,9651	C.V=10,92		

- 2A Análisis de Varianza de los datos sin considerar el efecto de fungicida sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* de La Lola y Guápiles, y los factores e interacciones significativos.

F.V.	C.M	Fcal	Pr>F
Modelo	19440,8563	20,56	0,0001
Error	945,4822		
Secuencia		72,66	0,0001
Humedad		17,74	0,0015
Localidad		11,11	0,0067
Desecación		8,76	0,0130
Secuenc*Humeda		27,46	0,0001
R ² =0,9573 C.V.=15,93			

- 3A Análisis de varianza para los datos sobre la población de *Mycosphaerella fijiensis* de plátano y banana procedente de La Lola y los factores e interacciones significativos.

F.V.	C.M.	Fcal	Pr>F
Modelo	28588,548	79,48	0,0001
Error	359,712		
Secuencia		164,58	0,0001
Humedad		276,22	0,0001
Fungicida		1252,43	0,0001
Secuenc*Humedad		36,38	0,0001
Secuenc*Fungici		15,04	0,0001
Humeda*Fungici		26,93	0,0001
Hosped*Fungici		2,63	0,0478
Secuenc*Humed*Fungici		7,71	0,0001
R ² =0,9931 C.V.=16,40			

4A Análisis de varianza para los datos sobre la población de *Mycosphaerella fijiensis* de banano procedente de Guápiles y La Lola y los factores e interacciones significativos.

F.V.	C.M	Fcal	Pr>F
Modelo	23995,89	31,86	0,0001
Error	753,10		
Secuencia		21,36	0,0001
Humedada		18,87	0,0001
Localidad		9,01	0,0045
Fungicida		514,31	0,0001
Secuen*Humed		25,71	0,0001
Secuen*Fungi		17,95	0,0001
Humed*Fungici		3,98	0,0079
Desec*Fungici		3,00	0,0290
Secue*Humed*Fungic		5,48	0,0001
R ² =0,9832		C.V.=28,26	