Biblioteca Conmemorativa
OIRSA - IICA - CATIE
13 DIC 2002
RECIBIDO
Turrialba, Costa Rica

CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

"Sensibilidad de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet a fungicidas sistémicos en plantaciones de plátano, en Panamá"

LUIS GERARDO ALVARADO MC INTIRE

CATIE *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*

PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSGRADUADOS

CATIE
13 DIC 2002
RECIBIDO
Turrialba, Costa Rica

"SENSIBILIDAD DE LAS POBLACIONES DE *Mycosphaerella fijiensis* Morelet A FUNGICIDAS SISTÉMICOS EN PLANTACIONES DE PLÁTANO EN PANAMÁ"

Tesis sometida a consideración por el Comité Técnico Académico del Programa de Enseñanza de Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Para optar al grado de:

Magíster Scientiae
en
Agricultura Ecológica

POR

Luis Gerardo Alvarado Mc Intire

Turrialba, Costa Rica
2002

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Alba Stella Riveros, Ph.D.
Consejero Principal

Franklin Rosales, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

Luis Pocasangre, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

Mauricio Guzmán, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Carl Williams, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Leonardo Marcelino, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Ali Moslemi, Ph.D.
Director Programa de Educación y
Decano de la Escuela de Posgrado

Luis Gerardo Alvarado Mc Intire
Candidato

Dedicatoria

A mis padres Juan y María, quienes me han dado en cada uno de sus días, todo el amor y cariño que un padre puede dar a un hijo. Gracias a ambos por todos sus consejos, sacrificios y apoyo.

A mi hermano Juan y a mis dos hermanas Marelisa y Karina, por los ánimos que me dieron de seguir adelante hasta alcanzar esta nueva meta.

Agradecimientos

A la institución donante de la beca: IDIAP

A las autoridades del CATIE.

A mi Consejero Principal Ph. D. Alba Stella Riveros, por guiarme en este trabajo, por su amistad, comprensión y ayuda como ser humano en todo momento. Gracias por todo el tiempo dedicado a mi formación como investigador.

A los miembros del Comité Asesor: Ph. D. Franklin Rosales, Ph. D. Luis Pocasangre, M.Sc. Mauricio Guzmán, MSc. Leonardo Marcelino, MSc. Carl Williams; por darme todo el apoyo que recibí en cada una de las etapas de desarrollo de este trabajo, tanto en el campo como en laboratorio.

A todo el Personal del IDIAP y la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá, por todas las facilidades y apoyo recibido.

Al personal de CORBANA, especialmente al señor, Fabio Blanco por la ayuda brindada con el análisis estadístico de los datos.

Al Ing. Luis Pinto, por la oportunidad y confianza brindada.

A Fabiola, por todo su amor y las alegrías que hemos vivido juntos en estos dos años que en verdad, han sido los mejores de mi vida.

A Luis y Antonio, por la paciencia, esfuerzo y entusiasmo que demostraron en cada momento, aun en los más difíciles.

Cada uno de los compañeros, especialmente a Katiuska, Arlen, Adriana, María Jesùs, Suyapa, Luiggi, Edgar, William, Giovani colombia, al pinche Jorge. A los hondureños por sus ricas baleadas, a los guatemaltecos por los partidos de fútbol, a los nicaragüenses por el exquisito chancho con yuca, a los costarricenses por su hospitalidad. Gracias a todos ustedes por ser los buenos amigos que han demostrado ser.

En fin, quiero agradecer a todos y a cada una de las personas que de forma directa o indirecta me ayudaron a alcanzar esta meta.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA iii

AGRADECIMIENTOS iv

RESUMEN vii

SUMMARY ix

INDICE DE TABLAS xi

INDICE DE FIGURAS xii

1. INTRODUCCION 1

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 1
1.2 OBJETIVOS 3
1.2.1 Objetivo General 3
1.2.2 Objetivos Específicos 3
1.3 HIPÓTESIS 4

2. REVISION DE LITERATURA 5

2.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO 5
2.2 SIGATOKA NEGRA 8
2.2.1 Origen y Distribución de la Sigatoka negra 8
2.2.2 Biología y Morfología de Mycosphaerella fijiensis 9
2.2.3 Ciclo de vida 11
2.2.4 Producción de esporas 12
2.2.5 Síntomas de la enfermedad 13
2.2.6 Epidemiología 14
2.2.7 Diversidad genética 15
2.3 MÉTODOS DE CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA 16
Prácticas culturales 17
Mejoramiento genético 18
Control biológico 18
Control químico 19
2.4 RESISTENCIA A FUNGICIDAS 21
2.4.1 Aspectos generales sobre resistencia 21
2.4.2 Mecanismos de Resistencia 23
2.4.3 Factores que influyen en el desarrollo de la resistencia 24
2.4.3 Algunos fungicidas sistémicos de uso frecuente 25
2.5 ESTRATEGIAS PARA EL MANEJO RACIONAL DEL CULTIVO 30
2.5.1 Control químico 30
2.5.2 Manejo integrado de la enfermedad. 32

3. MATERIALES Y METODOS 33

3.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO 33
3.2 DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA 33
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL 34
3.4 MODELO MATEMÁTICO 35
3.5 RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL 35
3.6 DESCARGAS DE ASCOSPORAS 36
3.7 AISLAMIENTOS MONOASCOSPÓRICOS 38
3.8 ANÁLISIS DE LABORATORIO 39
3.8.1. Sensibilidad de las ascosporas 39
3.8.2. Sensibilidad de aislamientos monoascospóricos 40
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 40

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42

4.1 PROPICONAZOLE 42
4.2 AZOXISTROBINA 46
4.3 BENZIMIDAZOL 53

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 57

5.1 CONCLUSIONES 57
5.2 RECOMENDACIONES 58

7. BIBLIOGRAFÍA 59

ALVARADO MC INTIRE, L. G. 2002. Sensibilidad de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, a fungicidas sistémicos en plantaciones de plátano, en Panamá. Turrialba, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. CATIE. 83 p

Palabras claves: *Mycosphaerella fijiensis*, Sigatoka negra, fungicidas sistémicos, propiconazole, azoxistrobina, benzimidazol, sensibilidad a fungicidas, resistencia a fungicidas, plátano, Panamá.

RESUMEN

La Sigatoka negra es una de las principales enfermedades que ataca al cultivo de plátano en Panamá, la cual reduce el rendimiento y productividad de las plantas, impidiendo la cosecha de frutos de excelente calidad que cumplan con las normas establecidas para su exportación.

Con el objetivo de estudiar el nivel de sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas sistémicos de control químico comúnmente utilizados (propiconazole, azoxistrobina y benzimidazoles); se realizaron pruebas *in vitro* de conteo de ascosporas y crecimiento de colonias a partir de conidios, que consistieron en la aplicación de cinco diferentes concentraciones de propiconazole (Tilt®) y cuatro de azoxistrobina (Bankit®) y Benzimidazol (Benlate 50 PS), a poblaciones del patógeno provenientes de zonas del cultivo tratadas y no tratadas con estos agroquímicos. La finca San Bartolo, población silvestre no tratada, fue contrastada con dos fincas (Cedro y Corotú) tratadas que corresponden a áreas de extensa e intensiva producción de plátano para la comercialización.

Los resultados reflejan niveles muy bajos de pérdida de sensibilidad del hongo al propiconazole, los cuales no pudieron ser detectados estadísticamente para ninguna de las dos fincas de la zona tratada. Sin embargo, a las dosis discriminatorias de 1.0 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1} de los fungicidas azoxistrobina y benzimidazol, se pudo observar una leve reducción de los niveles de sensibilidad del hongo a estos productos, sugiriendo la presencia en campo de pequeños grupos de ascosporas que ya han iniciado procesos de cambios en su estructura genética, dirigidas a evadir la acción de estas sustancias químicas.

En las pruebas realizadas con el crecimiento de colonias, se pudo observar el mismo comportamiento de las tres fincas al efecto de los fungicidas sistémicos evaluados. Para el fungicida propiconazole, no se pudieron establecer diferencias estadísticas claras entre las CE_{50} de cada una de las poblaciones que lograran evidenciar la existencia de individuos menos sensibles a este producto; no obstante, para los fungicidas azoxistrobina y benzimidazol, los valores obtenidos para las CE_{75} de las fincas estudiadas, sí permitieron detectar una pérdida leve de la sensibilidad de las poblaciones del hongo provenientes de las zonas tratadas en relación a la silvestre.

Los niveles de similitud encontrados para el propiconazole, posiblemente se deban a condiciones de recombinación genética de individuos provenientes de zonas comerciales con los de las zonas silvestres; por otro lado, la pérdida de sensibilidad a los fungicidas azoxistrobina y benzimidazol, de las poblaciones tratadas con relación a la silvestre, sea una característica asosiada al modo de acción de los fungicidas evaluados.

ALVARADO MC INTIRE, L. G. 2002. Sensibility of the population of *Mycosphaerella fijensis* Morelet, to systemic fungicides in plantain plantations in Panama. Turrialba, Costa Rica. Thesis M Sc. CATIE 83 p.

Key Words: *Mycosphaerella fijensis*, black Sigatoka, systemic fungicides, propiconazole, azoxistrobina, benzimidazol, sensibility to fungicides, resistance to fungicides, plantain, Panamá.

SUMMARY

The black Sigatoka is one of the main diseases that attack the plantain crop in Panamá. It reduces the plants yield and productivity, impeding the harvest of high quality fruits which fulfill the normal export standards.

In order to study the level of sensibility of *Mycosphaerella fijensis* to the common-used systemic fungicides of chemical control (propiconazole, azoxistrobina, and benzimidazole) *in vitro* ascospores and colonies growth counting tests from conidios were done. The tests consisted of the application of five different concentrations of Propiconazole (Tilt®) and four of azoxitrobina (Bankit®), and Benzimidazol (Benlate 50 ps) to pathogenic populations coming from treated and non-treated areas with these agrochemicals. The San Bartolo farm a non-treated wild population was contrasted with two treated farms (Cedro and Corotu) which belong to areas of extensive and intensive traded plantain production.

The results show low levels of the fungus sensibility loss to Propiconazole, which could not be detected statistically for the both treated area farms. However, in the discriminatory doses of 1.0 mg L^{-1} and 5.0 mg L^{-1} of the asoxitrobina and benzimidazol fungicides a slight fungus reduction of the sensibility level to these chemicals was observed, suggesting the presence of small groups of ascospores that have started a process to change their genetic structure directed to avoid the action of these chemical substances.

The San Bartolo farm could not be taken as a reference farm from which to set the base line for the propiconazole fungicide because it was conformed by individuals (ascospores) coming from the treated areas. Nonetheless, it was valid to test the changes in the fungus sensibility towards the other two fungicides.

The tests showed a reduction of the pathogenic sensibility towards the azoxitrobina and benzimidazol fungicides. Although this reduction is still slight it should be taken into account to avoid the development of resistant populations to these systemic fungicides.

The study of the pathogenic population behavior to these fungicides generates information that allows to recommend a rational use of these fungicides in these plantain plantations which use characterized as subsistence and small-size farms.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cronología de la resistencia a los principales grupos de fungicidas utilizados en el mundo 26

Tabla 2: Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo del tubo germinativo de ascosporas, bajo el efecto de las diferentes dosis del fungicida propiconazole. 43

Tabla 3: Valores del porcentaje de pérdida de sensibilidad, con respecto a la finca San Bartolo, al fungicida propiconazole por dosis, en las dos poblaciones tratadas evaluadas. 46

Tabla 4: Longitud promedio del tubo germinativo en micras, de ascosporas que se desarrollaron bajo el efecto de las diferentes dosis del fungicida azoxistrobina. 46

Tabla 5: Porcentajes de inhibición del tubo germinativo de ascosporas por finca, cuando se aplicaron las diferentes dosis del fungicida azoxistrobina. 48

Tabla 6: Valores de la CE_{50} y la CE_{75} para las dos poblaciones de Cedro, Corotú y San Bartolo. 51

Tabla 7: Valores del porcentaje de pérdida de sensibilidad en relación a la población San Bartolo, al fungicida azoxistrobina por dosis, en las dos poblaciones tratadas evaluadas. 52

Tabla 8: Desarrollo de ascosporas por categoría, cuando estuvieron bajo el efecto de las diferentes dosis del fungicida benzimidazol 54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales provincias productoras de plátano en Panamá: Chiriquí, Bocas del Toro, Coclé, Darién, Veraguas y Panamá 6

Figura 2: Producción de plátano en el año 2001 según cifras de la FAO en el mundo, América Latina y en Panamá 7

Figura 3: Distribución de la Sigatoka negra en América Latina y el Caribe 9

Figura 4: Aspectos taxonómicos y morfológicos de M. fijiensis, agente causal de la Sigatoka negra 10

Figura 5: Estados en el desarrollo de los síntomas de la Sigatoka negra y factores que influencian su duración 11

Figura 6: Síntomas de la Sigatoka negra 14

Figura 7: Esquema del diseño experimental a utilizar y cuadro de grados de libertad 34

Figura 8: Formas a considerar de las ascosporas de M. fijiensis tratadas con el fungicida benomil 37

Figura 9: Número de ascosporas por categoría de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo para las poblaciones de Cedro, Corotú y San Bartolo, cuando se aplicó una dosis de 0.1 mg L^{-1} del fungicida propiconazole 43

Figura 10: Comparación de pendientes lineales de regresión de las fincas de Cedro, Corotú y San Bartolo 44

Figura 11: Número de ascosporas por categoría de crecimiento del tubo germinativo, cuando estuvieron bajo el efecto de las dosis 1.0 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1} del fungicida azoxistrobina 47

Figura 12: Número de ascosporas por porcentaje de categoría de inhibición del desarrollo del tubo germinativo, cuando estuvieron bajo el efecto de las dosis 1.0 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1} del fungicida azoxistrobina. 49

Figura 13: Comparación de pendientes lineales de regresión de las fincas de Cedro, Corotú y San Bartolo. 50

Figura 14. Número de ascosporas por categoría de desarrollo, cuando estuvieron bajo el efecto de las dosis 1.0 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1} del fungicida benzimidazol. 54

1. INTRODUCCION

1.1 *Planteamiento del problema*

Comparando los registros a nivel mundial de superficie cultivada, producción y mercadeo del plátano se encuentra que, para el año 2001, el área sembrada alcanzó un total de 4.7 millones de hectáreas con 29.2 millones de Tm producidas, lográndose un total de importaciones de 354,488 Tm que representan la suma de 95,280,000 US$. Las regiones más productoras en el mundo están en Africa (70.7%), América Latina y el Caribe (25.4%) y un bajo porcentaje en los países del Asia (3,9%) (FAO, 2002).

El cultivo del plátano es muy importante para los países tropicales y se caracteriza por ser de subsistencia y producido por pequeños o medianos agricultores, el cual aporta ingresos importantes para la economía familiar. Se calcula que un 99% de la producción mundial de plátano tiene como destino el mercado interno de los países productores.

En Panamá, se estima un área cultivada de 9,800 hectáreas alcanzando una producción de 100,000 Tm. Esto hace un aporte de participación a la producción de América Latina y el Caribe en un 1.4%, con un comportamiento estable en los últimos cinco años (FAO, 2002). El plátano en Panamá se ha constituido en un renglón de gran importancia socioeconómica ya que contribuye a la generación de empleos y participa dentro de la canasta básica familiar registrándose un consumo per cápita de 34 kg (Marcelino y González, 2001).

Entre los problemas fitosanitarios que afectan la producción del plátano podemos encontrar diversos tipos de enfermedades y plagas. La enfermedad conocida como Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es considerada la más destructiva, provocando enormes pérdidas. Este hongo produce necrosis del tejido foliar, generando una reducción en la producción de un 50% o más en fincas de pequeños productores.

Métodos de control como la deshoja fitosanitaria, ha sido muy utilizada entre los pequeños agricultores y algunos otros, recientemente estudiados, emplean diferentes estrategias de control biológico e inductores de resistencia. Estos últimos están siendo evaluados y requieren de mayor tiempo para ser implementados masivamente (Arciniegas *et al*, 2002;

Patiño, 2002). De la misma manera, métodos de control genético, siguiendo sistemas de cruzamiento convencionales, han aportado nuevos híbridos con resistencia a Sigatoka negra y otras enfermedades; sin embargo, estos materiales generados por los diferentes grupos de investigación en mejoramiento genético en el mundo, están siendo evaluados bajo condiciones naturales en campo en diferentes zonas agroecológicas de los países cultivadores (Rosales y Pocasangre, 2002).

A pesar de su mayor efectividad, el control químico como alternativa, resulta muy costosa para los productores de plátano que en su mayoría son pequeños agricultores. Considerando la experiencia del uso desmedido de estos químicos, en el cultivo del banano, donde se reporta que esto trajo como consecuencia el desarrollo de resistencia por parte del patógeno hacia los fungicidas, se ha registrado un aumento en el número de aplicaciones que son necesarias para lograr una reducción en los daños que esta enfermedad causa al cultivo y por tanto, se han elevado aún más los costos de producción (Romero y Sutton, 1997).

No obstante, a la fecha, el control químico de la Sigatoka negra continua siendo la estrategia con mayor eficiencia, donde el uso alterno de fungicidas sistémicos con diferentes modos de acción o de fungicidas sistémicos y protectantes, se ha convertido en la práctica más comúnmente utilizada por los agricultores.

Entre los fungicidas sistémicos más usados están el benomil y el propiconazole; este último, tiene un modo de acción diferente al del benomil inhibiendo la desmetilación del carbono 14, en la biosíntesis del ergosterol. Otro de los fungicidas sistémicos utilizado es la azoxistrobina y su modo de acción consiste en la inhibición de la respiración mitocondrial del hongo (Guzmán y Romero, 1997).

En entrevistas realizadas con productores de plátano en Panamá, se reconoció a la Sigatoka negra como una de las principales enfermedades que ataca a las plantaciones y en consecuencia, como la principal limitante de la producción (Marcelino y Quintero, 1994).

De acuerdo con lo anterior, se puede afirmar que el desarrollo de resistencia de *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas, no solo se traduce en un aumento de los costos de producción debido al mayor número de aplicaciones que son necesarias, sino también, en una reducción de la calidad del ambiente y de recursos como el suelo y las fuentes de agua

e incluso en la salud humana y animal. Trabajos realizados por técnicos del MIDA (Ministerio de Desarrollo Agropecuario) y del IDIAP (Instituto de investigación Agropecuaria de Panamá), señalan que una de las principales problemáticas en esta actividad lo constituye el uso indiscriminado de los productos químicos como única alternativa actual para el control de las plagas y enfermedades, poniendo en un riesgo potencial a la población que desconoce el nivel de contaminación causado por estos productos (IDIAP, 1996).

El objetivo principal por el cual se desarrolló esta investigación fue el de realizar pruebas de sensibilidad a *Mycosphaerella fijiensis* para tres diferentes fungicidas sistémicos (Tilt, Benlate y Bankit) comúnmente utilizados por los agricultores, en poblaciones del hongo tratadas con fungicidas provenientes de fincas comerciales y en poblaciones silvestres provenientes de fincas no comerciales; pretendiéndose de esta manera, conocer el grado de resistencia que este patógeno ha logrado desarrollar en las plantaciones de plátano y con ello contribuir a reducir o proponer un programa de manejo del agroquímico más compatible con el medio ambiente.

1.2 *Objetivos*

1.2.1 Objetivo General

Determinar la sensibilidad a fungicidas sistémicos de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* para contribuir a un mejor manejo de la Sigatoka negra, mediante el uso racional de agroquímicos en el cultivo de plátano en Panamá.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Establecer *in vitro* la línea base de sensibilidad a los principales fungicidas sistémicos (Tilt, Benlate y Bankit) utilizados para el combate de la Sigatoka negra.

- Determinar si entre las poblaciones analizadas existen diferencias en la sensibilidad a los fungicidas sistémicos mediante el conteo de ascosporas y el desarrollo de colonias a partir de conidios.

- Comprobar la existencia de pérdida de sensibilidad a fungicidas en plantaciones sometidas a tratamiento.

1.3 *Hipótesis*

1. La pérdida de sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas sistémicos en plantaciones de plátano esta en función de los productos utilizados y los ciclos de aplicación.

2. Existen diferencias significativas en sensibilidad entre las poblaciones de *M. fijiensis* a los principales fungicidas sistémicos utilizados.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 *Generalidades del cultivo*

El plátano y banano son originarios de la zona comprendida al sur del trópico de Cáncer, en el océano Pacífico, área que se extiende entre el archipiélago de las Filipinas y la península de Malaca, Mar de la China Meridional y Mar de Java, en la que se encuentran las húmedas y calurosas tierras de Birmania, Tailandia, Laos y Camboya, en el continente, y las islas de Sumatra, Java, Borneo, Nueva Guinea y centenares de islas de Indonesia al sur del ecuador (Hernández 1991). Este cultivo fue introducido al Mediterráneo en el año 650 D.C., en manos de los árabes cuando éstos realizaban sus expediciones al continente africano. Luego, a inicios del siglo XIV, los portugueses lo llevaron a las Islas Canarias desde África, desde donde un sacerdote español, veinticinco años después del descubrimiento de América, lo estableció en Santo Domingo como un cultivo y desde allí se extendió por todo el Caribe (Cortés, 1994).

El plátano en Panamá es un cultivo que se produce durante todo el año. Existe la tecnología para su producción, generada por el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) y complementada por empresas multinacionales que han suministrado conocimiento y tecnología a los productores, especialmente en las áreas de Chiriquí y Bocas del Toro.

Actualmente, en Panamá se cultivan alrededor de 10,326 hectáreas de plátano, distribuidas entre aproximadamente 4,082 productores. La producción anual oscila en las 95,000 toneladas métricas, la cual proviene principalmente de las provincias de Chiriquí, Darién, Bocas del Toro, Panamá, Coclé y Veraguas, siendo estas las regiones más productoras de plátano del país. La mayor producción ocurre entre los meses de agosto a febrero y disminuye de marzo a julio.

La provincia de mayor producción es la de Chiriquí, específicamente los distritos de Barú y Renacimientos. Actualmente, esta región cuenta con unas 5,544 hectáreas cultivadas por 2,121 productores, quienes cultivan principalmente las variedades Cuerno Rosado y Cuerno Blanco, siendo esta última la más utilizada. A diferencia del distrito de Barú, en Renacimientos el cultivo de plátano se realiza en sistemas mixtos junto con el cultivo del café.

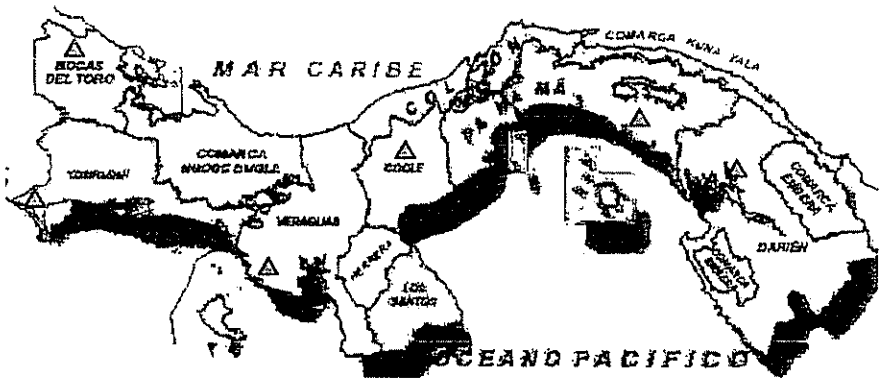


Figura 1: Principales provincias productoras de plátano en Panamá: Chiriquí, Bocas del Toro, Coclé, Darién, Veraguas y Panamá (indicadas con el triángulo rojo).

El distrito de Barú es la región de mayor producción dentro de la provincia de Chiriquí. Aquí, el 45% de las plantaciones tienen una extensión de 0.5 a 2.5 hectáreas, con una densidad de siembra menor a las 2000 plantas por hectárea, no se fertiliza y tampoco existe un manejo adecuado de las plagas. Un 51% de las plantaciones alcanzan desde 3 a 30 hectáreas, a las cuales se les brinda un manejo aceptable por parte de los productores. La densidad de siembra es de 2,000 plantas por hectárea, no aplican fungicidas y no cuentan con riego. Solo 88 hectáreas cuentan con sistemas de riego y programas de aplicación de fungicidas.

Aproximadamente el 90% de la producción nacional es comprada por los intermediarios y su destino final es la ciudad de Panamá, Colón y las Provincias Centrales. Los precios para el consumo nacional, fluctúan de acuerdo a la época. En los meses de mayor producción, éstos pueden bajar hasta $1.50 las cien unidades, pero en promedio se mantienen entre $3.00 y $4.50. En los meses de escasez, los precios suben hasta $6.50, con un rango que se mantiene entre los $4.50 y $5.00, por cada cien unidades.

En el área de Barú existe una planta empacadora de plátano para la exportación; sin embargo, las exportaciones son esporádicas, ya que no existe suficiente producción con la calidad exigida por los mercados internacionales. En 1998 se exportaron alrededor de 250,000 libras de este producto, mientras que en el año de 1999 no se exportó plátano en la provincia de Chiriquí.

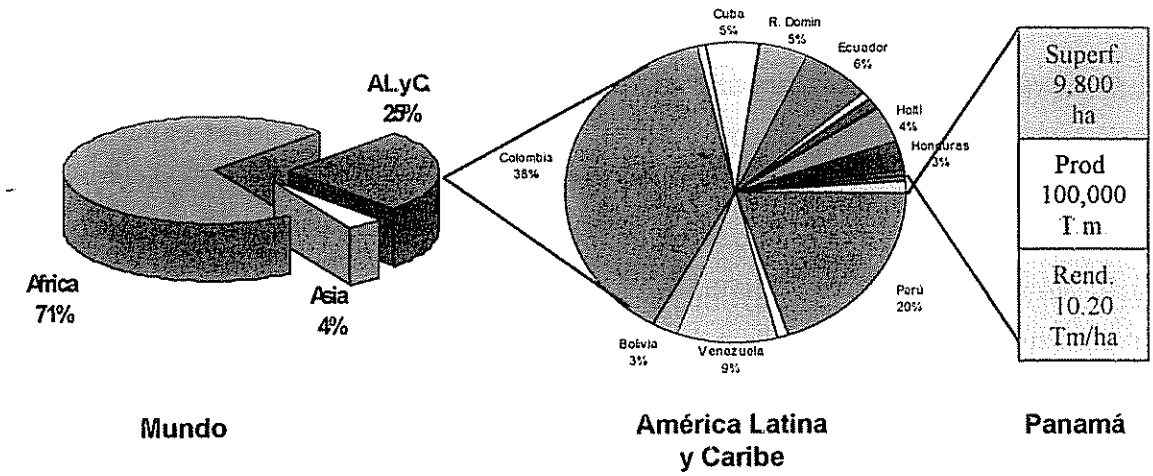


Figura 2: Producción de plátano en el año 2001 según cifras de la FAO en el mundo, América Latina y en Panamá

Entre los principales problemas que afectan la producción de plátano en Panamá podemos decir que: (a) inexistencia de un sistema de riego para contrarrestar los efectos de la sequía; (b) ausencia de mecanismos para que el pequeño productor tenga acceso al crédito por parte de la banca; (c) no existen aún, variedades resistentes al ataque de la Sigatoka negra y no aplican el manejo integrado para su control; (d) densidades de siembra inapropiadas; (e) los niveles óptimos de fertilizantes para las siembras en densidades medias y altas no están bien definidos; (f) irregularidad en los niveles de producción, lo que no permite sostener una exportación en forma consistente; (g) riesgo potencial de la población, debido al desconocimiento del nivel de contaminación por el empleo de plaguicidas como única alternativa actual, para controlar plagas y enfermedades y (h) falta de información sobre producción y manejo adecuado para la obtención de semilla de calidad.

Entre las plagas y enfermedades más conocidas que atacan a este cultivo podemos mencionar, a las causadas por: bacterias como *Ralstonia solanacearum* que produce el Moko (Thwaites 2000); las causadas por hongos como el Mal de Panamá, la Sigatoka negra y amarilla; las ocasionadas por los virus como BSV y CMV (Lokhart and Jones 2000), algunas plagas como el picudo (*Cosmopolites sordidus*) y los ataques de nematodos del género *Meloidogyne, Radopholus y Pratylenchus* (Stover y Simmondds, 1987).

2.2 *Sigatoka negra*

La Sigatoka negra es la enfermedad foliar más devastadora que ataca al género *Musa*, es conocida como raya negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (forma asexual *Paracercospora fijiensis*). La enfermedad se manifiesta con la aparición de manchas foliares, las cuales con el tiempo producen un acelerado deterioro del área fotosintética. En algunos casos, cuando no se aplica ningún tipo de control y existen condiciones climáticas favorables, la enfermedad logra destruir casi en su totalidad las hojas de la planta, lo cual afecta negativamente la producción. Esta condición impide un desarrollo normal de los racimos de fruto, causando su maduración anticipada y reduciendo la longitud del dedo a un nivel en el cual pocos reúnen los requisitos mínimos para la exportación. En lugares donde no existe o hay poca presión por la enfermedad, la planta mantiene de 10 a 12 hojas maduras sanas a la floración y entre 5 ó 6 al momento de la cosecha (Stover, 1987).

2.2.1 Origen y Distribución de la Sigatoka negra

La Sigatoka negra se identificó por vez primera en 1963 en la costa sudeste de Viti Levu (Islas Fiji) (Rhodes 1964). Seguidamente, se registró su presencia en el Pacífico (estrecho de Torres y península del Cabo York en Australia, Papua Nueva Guinea, Islas Salomón, Vanuatu, Nueva Caledonia, Isla Norfolk, Estados Federales de Micronesia, Tonga, Samoa Occidental, Isla Niue, Isla Cook, Tahití y Hawai). También, se ha observado en Asia en la localidad de Bután, Taiwan, sur de China incluida la isla de Hainan, Vietnam, Filipinas, Malasia Occidental y Sumatra en Indonesia (Stover 1987).

En América Latina, la Sigatoka negra se describió por primera vez en Honduras en el año de 1972 (Stover y Dickson, 1976), desde donde se diseminó hacia Guatemala y Belice, llegando al sur de México en 1981(Orozco *et al.* 2001). Posteriormente, se estableció en El Salvador, Nicaragua, Costa Rica en 1979 (Marín y Romero,1992) y en Panamá en 1981 (Marcelino y Quintero, 1992). Siguió por Colombia, Ecuador y Perú (Merchan, 1990). Se ha registrado en Venezuela y en Cuba en 1991 (Martínez *et al.* 1998; Pérez, 1998), en Jamaica y la República Dominicana en 1996 (Lescot *et al.* 2000), en Bolivia en 1997 (Tejerina et al, 1997) y por último en Brasil en 1998 (Cordeiro *et al* 1998).

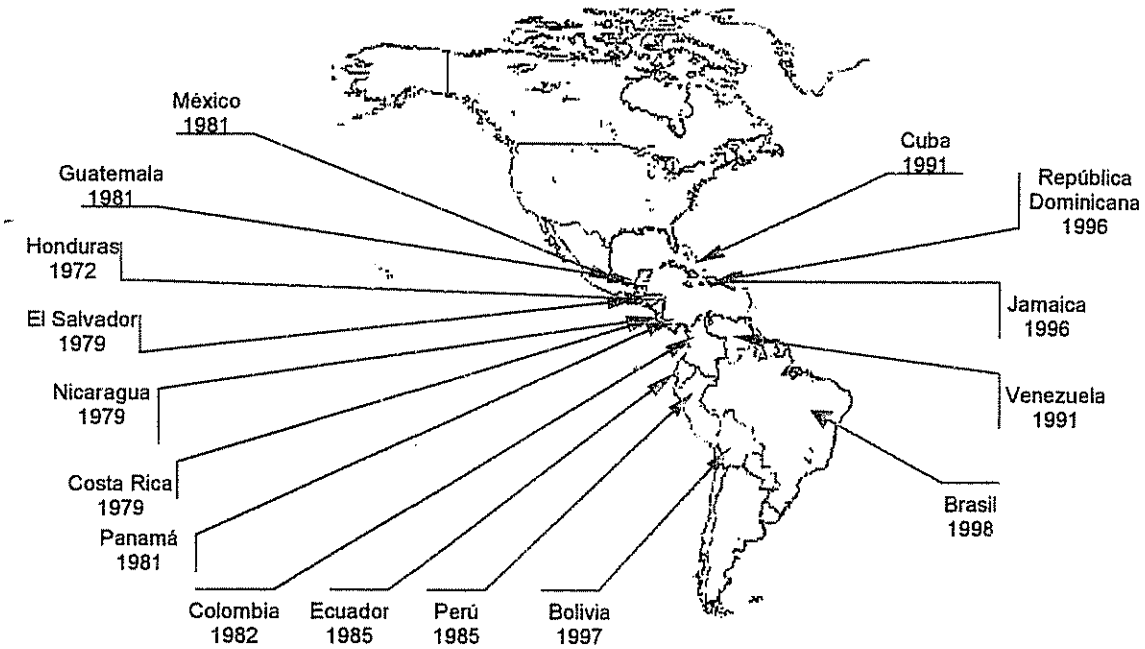


Figura 3: Distribución de la Sigatoka negra en América Latina y el Caribe

En África, esta enfermedad se documentó por vez primera en Zambia en 1973 (Raemaekers 1975) y en Gabón en 1978 (Frossard 1980). Luego se extendió a lo largo de la costa occidental hacia Camerún, Nigeria, Benin, Togo, Ghana y Costa de Marfil. Presente, igualmente, hacia 1987 en la República democrática del Congo (ex Zaire), alcanzando Burundi, Ruanda, el oeste de Tanzania, Uganda Kenia y la República Centroafricana.

2.2.2 Biología y Morfología de *Mycosphaerella fijiensis*

Mycosphaerella fijiensis, responsable de la Sigatoka negra, ha sido clasificada taxonómicamente dentro de la clase Ascomycetes y en el orden de los Dothideales (Fig. 2.B). Este hongo se caracteriza por presentar dos formas reproductivas claramente diferenciadas en su fase sexual y asexual, lo cual le permite a este patógeno poseer una amplia capacidad y alto rango de infección por sus estructuras reproductivas que genera (Fig. 2A y 2C).

Los conidióforos se desarrollan inicialmente en las rayas café o cerca de éstas, sobre el envés de la hoja y continúan siendo producidos únicamente hasta el segundo estado de la

enfermedad. Pueden ser rectos o curvados, y tienen de cero a cinco segmentos con medidas que alcanzan entre las 16.5 - 62.5 µm x 4 – 7 µm.

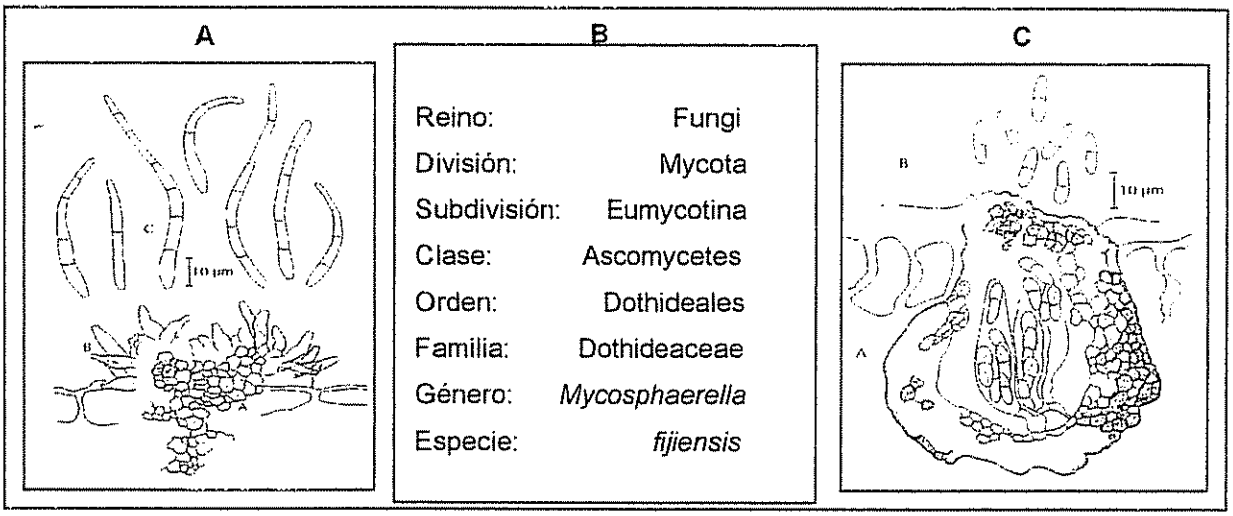


Figura 4: Aspectos taxonómicos y morfológicos de M. fijiensis, agente causal de la Sigatoka negra (A) fase sexual; (B) taxonomía y (C) fase asexual

Los conidios son formados a partir de los conidióforos, ya sea uno por cada conidioforo o en pequeños grupos compuestos por cuatro a ocho conidios. Es cilíndrico y puede estar formado por uno o diez segmentos, siendo comúnmente entre cinco y siete. Aparecen extendidos o curvados con una forma obtusa en el ápice y truncados o redondeados en la base y su longitud puede estar entre las 30 a 132 µm (Fig. 2.A).

Aunque *M. fijiensis* y *M. musicola*, en un inicio, fueron ubicados en el género *Cercospora*; ahora se han separado como *Paracercospora fijiensis* y *Pseudocercospora musae*, respectivamente (Deighton, 1976, 1979; Pons, 1990). Los dos patógenos pueden ser diferenciados microscópicamente por las características de sus conidios y conidióforos. Los conidios de *M. fijiensis* son más largos que los de *M. musicola* y además su hilium basal es más denso. También, los conidióforos de *M. fijiensis* poseen cicatrices, las cuales están ausentes en los conidióforos de *M. musicola*.

Los estados sexuales de *M. fijiensis* y *M. musicola* son morfológicamente similares (Meredith and Lawrence, 1969, 1970; Mulder and Stover, 1976). El espermogonio se desarrolla en estado tres a cuatro, cuando las rayas se convierten en mancha y son más abundantes en el envés de la hoja. Tienen una forma ovalada y mide unas 55 a 88 µm x 35 a 50 µm. El ostiolo

es más prominente y sobresalen a través del poro estomatal. La espermatia madura es transparente, en forma de barra y alcanza a medir 2.5 – 5.0 µm x 1.0 – 2.5 µm.

Los peritecios varían en cuanto a sus características, pero en su mayoría son globulares con un diámetro entre las 47 a 85 µm. Éstos están inmersos en el tejido de la hoja y se pueden observar en ambas superficies, aunque son más abundantes en el haz. Las numerosas ascas son bitunicadas, oclavadas y sin parafesis. Las ascosporas tienen dimensiones que alcanzan las 12.5 – 16.5 µm x 2.5 – 3.8 µm y son biceldadas con la célula más predominante unida al asca (Mulder and Holliday, 1974).

2.2.3 Ciclo de vida

Mycosphaerella fijiensis Morelet, presenta una reproducción sexual por medio de ascosporas y una asexual por conidios, siendo la primera la más importante en la proliferación de la enfermedad (Marín y Romero, 1992).

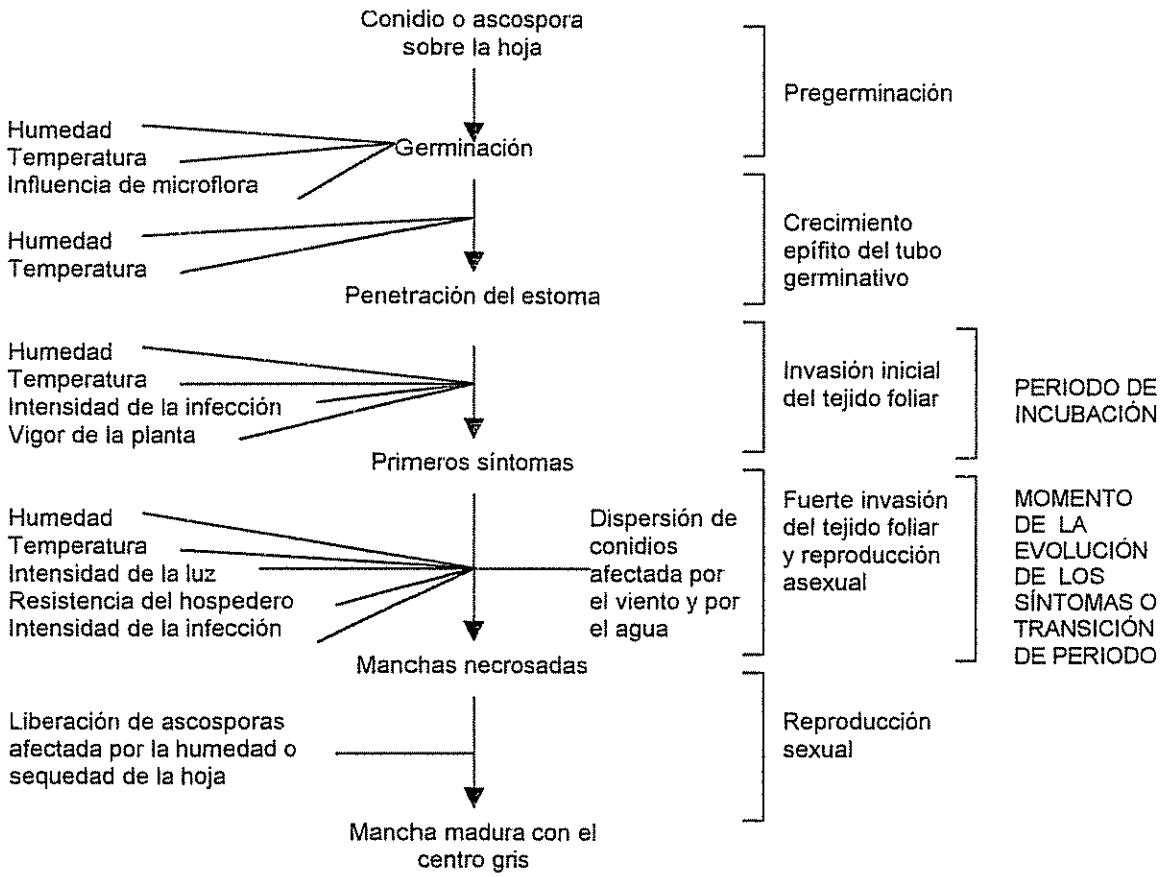


Figura 5: Estados en el desarrollo de los síntomas de la Sigatoka negra y factores que influencian su duración (Tomado de Fouré y Moreau 1992).

El ciclo de vida se inicia con la germinación de las esporas seguidas de la penetración. Ambos procesos requieren de la presencia de una película de agua sobre la superficie de la hoja. La germinación de las esporas se da en aproximadamente dos horas. Aparecen los tubos germinativos los cuales se alargan y ramifican en búsqueda de los estomas, pues a través de ellos penetran el tejido vegetal. Dicha penetración ocurre entre la 48 y 72 horas si las condiciones de humedad son favorables y la temperatura es próxima a los 26°C. El desarrollo de las primeras lesiones da inicio a la fase asexual, apareciendo por los estomas algunos conidióforos, principalmente por el envés de la hoja (Stover y Simmonds, 1987).

El periodo de incubación, el cual es el tiempo comprendido entre la infección y la aparición del primer síntoma sobre la hoja, dura aproximadamente 17 días bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. A los 28 días de la infección aparecen los primeros conidios y a los 49 días finaliza el ciclo cuando se da la liberación de las primeras ascosporas (Merchán, 1998). Hay quienes afirman que el hongo puede completar su período de incubación en 10 a 14 días (Jones, 2000). Sin embargo, muchas veces este periodo se ve influenciado por las estaciones climáticas y por la variedad del cultivo que esta siendo atacada.

2.2.4 Producción de esporas

Los hongos *Mycosphaerella musicola* y *Mycosphaerella fijiensis* producen tres cuerpos de fructificación: el peritecio, el espermogonio y el conidióforo, los cuales producen los conidios. Estas estructuras se producen en una cámara bajo el estoma. En la superficie inferior de la hoja existe aproximadamente cuatro veces la cantidad de estomas que en la superior, es decir, se producen más estructuras de reproducción en la superficie inferior que en la superior (Stover 1972).

En hojas sin aspersión se hicieron conteos de conidióforos y conidias en manchas jóvenes de Sigatoka negra que no excedían de 20 mm^2. Cada mm^2 tiene un promedio de siete (7) estomas, con un promedio de 2.5 conidióforos por estoma, produciendo como promedio 8.5 conidios o cerca de 60 conidios por mm^2, o sea, 1,200 conidios por lesión en el envés de la hoja. En contraste *Mycosphaerella musicola* produce de 75 a 125 esporodoquios por lesión en el haz de la hoja y cada esporodoquio puede producir un promedio de 5.3 cosechas de 50

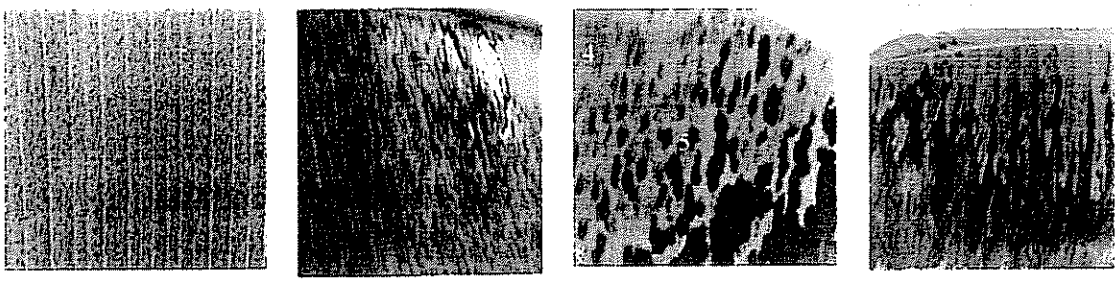
conidias cada una. Una lesión madura de *Mycosphaerella musicola* puede producir más de 30,000 conidios si se agrega un 50% más producidos en el envés de la hoja (Stover, 1980).

En Hawaii de 8,000 a 33,000 ascosporas por m^3 de aire en 24 horas fueron recolectadas con una trampa de esporas. En cuanto las hojas se mojan, ascosporas maduras son liberadas dentro de unos pocos minutos. Bajo condiciones óptimas de temperatura y precipitación, las ascosporas maduras pueden estar presentes tres a cuatro semanas después de la aparición de las primeras estrías (Stover, 1987).

Estudios sobre desplazamiento y producción de esporas realizados a partir del año de 1984 hasta 1986, permitieron establecer una clara relación entre las lluvias y el número de esporas liberadas. En el mismo momento y después de la lluvia, el número de esporas que eran detectadas en el aire aumentaba significativamente en comparación con aquellos días en que no se registraban lluvias. La liberación de esporas disminuía a medida que pasaban las horas hasta que finalmente se paralizaba. Cabe mencionar que lluvias débiles de menos de 1.6 mm por hora no eran, al parecer, suficientes como para provocar una alta liberación de esporas. Sin embargo, incluso cuando se presentaban fuertes lluvias de larga duración, la cantidad de esporas liberadas igualmente disminuían. Los resultados del estudio indicaron que ese comportamiento se debe a que el hongo necesita, por lo menos, un periodo de 24 horas para madurar y liberar nuevas esporas (Gauhl, 1992).

2.2.5 Síntomas de la enfermedad

El desarrollo completo de los síntomas puede ser desde 50 a 115 días; el período más largo se presenta en la época más seca del año; mientras que, en la temporada lluviosa el desarrollo es acelerado. En cualquier época del año, es posible encontrar todos los estadíos de la enfermedad, principalmente en las hojas más jóvenes. Cuando existe una alta cantidad de lesiones, se unen y destruyen grandes áreas de la hoja. En condiciones climáticas favorables para la infección y sin ningún tratamiento con fungicida, las hojas pueden morir dos o tres semanas después de los primeros síntomas (Ramírez y Rodríguez, 1988).



Estadío 2 Estadío 3 Estadío 4 y 5 Estadío 6

Figura 6: Síntomas de la Sigatoka negra (Fotos tomadas de Fouré, 1985).

Según Fouré (1985), el desarrollo de la enfermedad de la Sigatoka negra presenta los siguientes seis estadíos: (1) pequeña decoloración que solo se observa en el envés de la hoja. Incluye una pequeña pizca de color café rojizo dentro del área decolorada. No es visible a través de la luz; (2) pequeña estría de color café rojizo visible en el haz y en el envés; (3) la estría aumenta de grosor y longitud; se mantiene de color café rojizo; (4) hay cambio de color a café oscuro y negro. Este síntoma se considera como mancha; (5) la mancha negra esta rodeada por un halo amarillo y (6) la mancha nuevamente sufre cambios de color empieza a deprimirse entre las zonas más claras (gris blanco) y se observan los peritecios.

Gauhl (1992), pudo observar en pruebas de campo, que todos los periodos de evolución de la enfermedad surgieron primero en la parte izquierda del ápice de la hoja y luego, en la mayoría de los casos, en el ápice derecho. Posteriormente, los síntomas fueron apareciendo progresivamente en la parte central y por último en la base de la hoja.

2.2.6 Epidemiología

Mycosphaerella fijiensis tiene una reproducción sexual y otra asexual, lo que dificulta su manejo, dándole al patógeno una mayor capacidad de producir epidemias. En la fase sexual, la producción de conidios es mayor cuando la enfermedad atraviesa los estadíos tres y cuatro, sobre todo durante los períodos de mayor pluviosidad. La Sigatoka negra, en comparación con la Sigatoka amarilla, produce una menor cantidad de conidios por lesión. La Sigatoka negra produce aproximadamente 1,200 conidios en una lesión de 20 mm^2,

igual tamaño de superficie. La diferencia existe en que las densidades de lesiones de Sigatoka negra por unidad de superficie es mucho mayor (Merchán, 1998).

El transporte de conidios por el viento es 100 veces menos que la cantidad de ascosporas. Las esporas son la fuente de inóculo más importante ya que se transportan a largas distancias por el viento. Los conidióforos se presentan de manera continua hasta el segundo estadío de la mancha. En el centro de la mancha están los primeros conidióforos que dejan de producir conidios. Estos conidióforos salen uno a uno o en grupos de dos a ocho por los estomas del envés de la hoja (Stover y Simmonds, 1987).

Al igual que *Mycosphaerella musicola*, la lluvia, el rocío y la temperatura juegan un papel importante en el desarrollo y diseminación del inóculo de la Sigatoka negra. El tiempo seco, con temperaturas nocturnas inferiores a 20°C, disminuye el desarrollo de la enfermedad, aunque parece ser que este patógeno es menos sensitivo a las bajas temperaturas que *M. musicola*, cuando las lluvias son abundantes. En general, una rápida propagación y alta infección son favorecidas por el tiempo caluroso, lluvioso y con alta humedad en el ambiente (González 1987).

Las ascosporas, seguido de una lluvia, son comúnmente encontradas en el aire por encima del dosel de la plantación. Las corrientes de aire las transportan a través de largas distancias a otras plantas dentro de la plantación y a otras plantaciones. Estas mueren después de seis horas de estar expuestas a la radiación ultravioleta, lo cual indica que la distancia de diseminación de esporas viables es determinada, no solo por la velocidad del viento, sino también por la distancia recorrida y la hora del día en que ocurre. (Gauhl, 1992).

2.2.7 Diversidad genética

La estructura genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* fue estudiada por Carlier *et al*, (citado por Jones 2000). Como las ascosporas producidas durante la reproducción sexual juegan un papel importante en la epidemiología de la Sigatoka negra, el análisis de *Mycosphaerella fijiensis* requirió de estimaciones cuantitativas de parámetros genéticos poblacionales basados sobre las frecuencias alélicas en varios locus. Poblaciones de *M. fijiensis* tomadas de Filipinas, Papua Nueva Guinea, Africa, América Latina y las islas del

Pacífico fueron analizadas. Los resultados mostraron que las poblaciones de este hongo pueden mantener un alto nivel de diversidad genética comparado con las poblaciones de otros patógenos.

Las regiones de Australia y el sudeste de Asia pueden ser el centro de la diversidad de *Mycosphaerella fijiensis*. El nivel de diversidad genética encontrado en las poblaciones de Papua Nueva Guinea y Filipinas fue mucho más alto que el de las otras regiones. La mayoría de los alelos detectados en las poblaciones de América Latina, islas del Pacífico y Africa también fueron encontrados en las dos primeras regiones arriba mencionadas. Estos resultados apoyan la hipótesis que *M. fijiensis* se originó en Australia, sudeste de Asia y que fue recientemente introducida a otras regiones productoras de banana.

De estudios sobre patrones de detección y distribución de *M. fijiensis* y *M. musicola* en el sudeste de Asia y en el área de las islas del Pacífico, se sugiere que *M. fijiensis,* originalmente proviene del área de las islas Salmón en Nueva Guinea, además, porque en estas áreas se logran encontrar hospederos de la planta que han coevolucionado con la enfermedad, siendo localidades donde existen recursos de resistencia, especialmente diploides fértiles, los cuales pueden ser utilizados en los programas de mejoramiento.

Müller *et al.* (1997), usando oligonucleótidos mediante marcadores RFLP, demostró que la variabilidad genética de *M. fijiensis* en Nigeria existe sobre una micro y macro escala. La variabilidad ocurre dentro de una lesión entre lesiones, sobre una planta; y entre plantas y cultivares, de la misma forma que ocurre entre regiones geográficas.

2.3 *Métodos de control de la Sigatoka negra*

La Sigatoka negra se combate, principalmente, a través del control químico. También se utilizan las prácticas culturales tendientes a la reducción del inóculo (Ramírez y Rodríguez, 1988). Asimismo, otro sistema empleado es el control genético, el cual esta siendo evaluado en campo. En la última década, se han investigado métodos de control biológico mediante el empleo de substratos, antagonistas y enmiendas orgánicas (Arango 2000). Se han incorporado otros métodos alternativos de control a la enfermedad, ciertas moléculas inductoras de resistencia de la familia del Aci-benzolar (Actigard) que responden bien a la

inducción del Acido Acetil-salicílico (Patiño 2001). Estos métodos de control (biológico e inducción de resistencia) aún se encuentran en fase experimental y requieren de más investigación, antes de ser incorporados en programas de Manejo Integrado del cultivo.

Prácticas culturales

Estas prácticas están dirigidas principalmente a reducir la fuente de inóculo del patógeno y siempre están integradas o forman parte de un programa de manejo integrado de la enfermedad.

La experiencia en banano ha demostrado que el control de la enfermedad es más factible cuando existe un dosel cerrado (techo foliar compacto) del cultivo, lo cual resulta en menor humedad en las hojas por rocío en la parte baja e interior de dicho dosel. Para obtener un dosel cerrado, el marco de plantación debe ser ajustado a la fertilidad del suelo y condiciones que afecten el crecimiento, especialmente drenaje fertilización y control de malezas (Stover, 1987). En esta misma dirección, los trabajos de Belálcazar (2002) en el eje cafetero de colombiano sobre el manejo de plantaciones de plátano en altas densidades, indican que las condiciones de micro y mezo clima que se generan al interior del cultivo, crean un ambiente desfavorable para el patógeno.

El establecimiento de un buen sistema de drenaje es muy recomendado, ya que permite reducir los niveles de humedad en el suelo y microclima dentro de la plantación, reduciendo en cierto grado, las condiciones favorables para el establecimiento de la enfermedad.

Otra de las prácticas culturales corrientes es la deshoja fitosanitaria, la cual reduce la fuente de inóculo interna y debe hacerse en forma cuidadosa y bien planeada para evitar pérdidas enormes de tejido foliar y no causar así un daño mayor a la plantación. Cuando la infección se encuentra localizada se recomienda cortar solo la parte afectada ("despunte"); pero, cuando la infección se encuentra distribuida, es conveniente eliminar toda la hoja. En ocasiones, los hijos pueden mostrar infecciones fuertes, por lo que se recurre a cortar esas hojas. Esta labor se completa con la eliminación de las hojas agobiadas (Corrales y Marín, 1992).

Mejoramiento genético

La Sigatoka negra se favorece por la alta susceptibilidad de los principales clones de banano y plátano utilizados en explotaciones comerciales, lo que dificulta sustancialmente el manejo del problema. Por ello, la resistencia genética es una de las mejores alternativas para su control. Sin embargo, la obtención de materiales resistentes a la Sigatoka negra con características de rendimiento y calidad aceptables, es un trabajo difícil y lento.

Se han requerido no menos de 35 años de esfuerzos intensivos y caros de mejoramiento genético a cargo del Fondo Hondureño de Investigación Agrícola (FHIA), antes de que el primer híbrido comercial resistente a la Sigatoka negra fuera desarrollado y sembrado por los agricultores (Rowe y Rosales, 1994; Rowe 1998).

Los diploides agronómicamente mejorados que se usan en la actualidad en forma extensiva en el programa de la FHIA son: SH-3142, como fuente de resistencia al nematodo barrenador; SH-3362, con resistencia a la Raza 4 del Mal de Panamá y SH-3437 como fuente de resistencia a la Sigatoka negra y a *Pratylenchus*. Estos tres diploides son a su vez resistentes a la raza más común (raza1) del Mal de Panamá. Actualmente, en Cuba, se encuentran plantadas alrededor de 4,000 hectáreas de FHIA-03; 1,900 de FHIA-23 y 900 de FHIA-18, donde se reporta que estas plantaciones no reciben ningún tratamiento químico para el control de la Sigatoka negra y muestran un buen desempeño (Pérez, 2002; comunicación personal).

Control biológico

Sobre este método ya se han realizado algunas investigaciones que demuestran su futuro potencial como una alternativa al control de la Sigatoka negra. Sin embargo, aún se necesitan comprender algunos aspectos de la biología de estos microorganismos antagonistas empleados en el manejo de esta enfermedad.

En estudios realizados por Miranda (1996), a nivel de invernadero y con inoculación natural de la enfermedad, se observó que *Serratia marcescens* logra controlar, en las hojas de la planta, el desarrollo de la enfermedad de manera satisfactoria. Gutiérrez (1996), pudo

observar que los microorganismos formulados para la inducción de resistencia en banano contra la Sigatoka negra, permitieron obtener los menores niveles de infección sobre la planta, en comparación con el testigo agua y el sustrato. Por otra parte, los resultados obtenidos con pruebas a base de organismos promotores del crecimiento, demostraron que a mayor crecimiento de la planta, existe un menor nivel de infección.

Así mismo, Talavera (1996), identificó, bajo condiciones *in vitro*, cuatro cepas bacterianas de microorganismos productores de glucanasa con un carácter antagonista hacia *Mycosphaerella fijiensis* afectando en forma negativa, la germinación y longitud del tubo germinativo. No obstante, González (1995) concluyó que el control biológico de la Sigatoka negra es un método con pocas probabilidades de éxito pues, la alta virulencia y corto período de incubación de *Mycosphaerella fijiensis*, ponen en desventaja a las poblaciones del hongo antagonista.

Control químico

Según Cordero y González (1988), en los países donde se ha presentado la Sigatoka negra, el control químico se ha realizado utilizando fungicidas protectantes, sistémicos, sistémicos locales y aplicando mezclas de fungicidas sistémicos y protectantes.

La siguiente es una descripción breve de los principales tipos de fungicidas utilizados en las plantaciones de banano, señalando algunos de los grupos químicos presentes en estas sustancias

- **Fungicida protectante**

La función básica de estos fungicidas es la de prevención, donde la planta es cubierta por el producto, formando una capa superficial sobre las hojas, sin penetrar en ellas. El hongo al ponerse en contacto con el ingrediente activo del fungicida no se desarrolla, por lo tanto, no penetra en las células del tejido foliar (Cordero y González 1988).

Estos fungicidas, se utilizan cuando el porcentaje de infección es bajo, lo que sucede en épocas secas o cuando las condiciones son favorables. Tienen la desventaja de ser lavados

por las lluvias y la distribución en el envés de la hoja es incompleta. El modo de acción de estos fungicidas no es específico, actúan en muchos sitios dentro de las células del hongo, por lo que la probabilidad de obtener resistencia a estos fungicidas es bastante baja. Dentro de este tipo de fungicidas están los pertenecientes a los grupos químicos de los ditiocarbamatos como el mancozeb y el clorotalonil. (Marín y Romero 1992).

- **Fungicidas sistémicos**

Estos fungicidas tienen la capacidad de penetrar los tejidos y de ser movilizados a otras partes de la planta, contando con un modo de acción muy específico que interfiere con la síntesis de los esteroles. Es recomendado no utilizarlos en forma continua y prolongada para evitar la tolerancia del hongo y deben usarse solo cuando la presión de infección sea alta. Tienen la ventaja de no ser lavados por las lluvias, lo que permite reducir el número de tratamientos anuales y de ser compatibles con soluciones aceitosas y acuosas empleadas como adyuvantes (Cordero y González 1988).

Se cuenta con dos tipos de familias pertenecientes a este grupo: los Bensimidazoles y los Triazoles. Los Bensimidazoles actúan sobre la división celular, a nivel de mitosis. El fungicida más utilizado de este grupo es el Benomil (Benlate®). El modo de acción de los Triazoles es en la biosíntesis del ergosterol, pero actúan a un nivel diferente de las morfolinas, inhibiendo el proceso de metilación por lo que son llamados DMI's (sterol-demethylation-inhibiting) por sus siglas en inglés. El propiconazole más común es el Tilt® (Marín y Romero 1992).

Los fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol, son la base de los programas de combate de la Sigatoka negra en la mayoría de los países donde la enfermedad esta presente. Los fungicidas de este tipo más comúnmente utilizados son, el ya mencionado propiconazole y más recientemente el bitertanol (Guzmán y Romero, 1996).

La resistencia a los fungicidas de modo de acción específica como el benomil y el propiconazole, es uno de los factores que más influyen en las dificultades de controlar efectivamente la Sigatoka negra en el cultivo de Musáceas. Estudios en Costa Rica, han demostrado la existencia de una alta frecuencia de aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* resistentes a los fungicidas benomil y propiconazole en las plantaciones de bananos (Calvo y Romero, 1996).

- **Fungicidas sistémicos locales**

Este es un grupo intermedio de fungicidas, los cuales penetran en las hojas pero no se traslocan al resto de la planta. El Tridemorph (Calixin®) es el único fungida utilizado en banano, que se incluye en este grupo. Pertenece a la familia química de las morfolinas, cuyo modo de acción se encuentra entre los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (EBI's). Actúa en dos etapas diferentes en la biosíntesis de los ergosteroles, por lo que la generación de cepas resistentes a este fungicida es menos probable. Posee la ventaja de que no se ha encontrado resistencia cruzada a los triazoles, lo que permite que pueda ser empleado en la rotación de fungicidas de modo de acción distintos (Marín y Romero 1992).

2.4 *Resistencia a Fungicidas*

Los fungicidas han sido usados por alrededor de 210 años para proteger las plantas contra enfermedades causadas por hongos. El comienzo de la larga escala de aplicación de fungicidas para el combate de enfermedades fungosas está marcado por la mezcla de preparación artesanal de caldos bordéles elaborada por Millard en 1883. Esta preparación contenía, una mezcla de sulfato de cobre y cal, que permaneció como el fungicida más usado por más de 50 años (Dekker, 1982).

2.4.1 Aspectos generales sobre resistencia

La aparición repentina de la resistencia en una población de patógeno puede, cuando no se reconoce en una etapa temprana, tener como resultado el fracaso del control de la enfermedad y, consecuentemente, graves pérdidas de la cosecha. Dekker (1982), define la resistencia a fungicidas como el cambio hereditario de una célula fungosa o una población de un hongo a un fungicida, lo que resulta en una sensibilidad menor a lo normal hacia éste.

El uso comercial de un fungicida durante algunos años, puede generar poblaciones de patógenos blancos que no son lo suficientemente sensibles para ser controlados adecuadamente. Ellos aparecen generalmente, como una respuesta al uso repetitivo del fungicida o al uso de otros fungicidas químicamente relacionados y/o con un mecanismo

bioquímico de acción fúngico similar. Las poblaciones del patógeno que desarrollan la resistencia a un fungicida pueden llegar a ser simultáneamente y automáticamente resistentes a otros fungicidas que son afectados por la misma mutación del gen, siguiendo el mismo mecanismo de la resistencia (Brent, 1995).

El mismo autor, señala que con la introducción de los fungicidas sistémicos, la incidencia de la resistencia creció y el tiempo de aparición de esta es a menudo relativamente corto. Una vez que surge, se ha encontrado que la resistencia es heredable.

Dekker (1995) - Georgopoulos y Brent (1995) presentan las siguientes clases de resistencia:

Resistencia discreta: se caracteriza por una repentina y marcada pérdida de efectividad y por la presencia de poblaciones sensibles y resistentes del patógeno las cuales difieren ampliamente en su respuesta hacia el fungicida.

Resistencia cuantitativa: se caracteriza por una pérdida lenta del control de la enfermedad y en la sensibilidad de la población del patógeno. A través de la disminución en el uso del fungicida y en la alternancia con fungicidas de diferente modo de acción, esta resistencia puede ser revertida a poblaciones nuevamente sensibles.

Resistencia cruzada: se presenta cuando las poblaciones de un patógeno en particular desarrolla resistencia a un fungicida y automática y simultáneamente se hace resistente a otros fungicidas que son afectados por la misma mutación y por el mismo mecanismo de resistencia.

Resistencia múltiple: algunos patógenos pueden poseer mecanismos de resistencia separados a dos o más fungicidas no relacionados. Estos han surgido a partir de mutaciones independientes que fueron seleccionadas por exposición a cada uno de los fungicidas.

2.4.2 Mecanismos de Resistencia

Para entender el mecanismo de resistencia a los fungicidas es necesario conocer la acción de éstos. Muchos compuestos afectan principalmente la respiración o, más generalmente, la producción de energía; otros afectan muchos procesos de biosíntesis y unos pocos compuestos destruyen las células, por afectación directa de la membrana. Con la excepción de "dexon", carboxin y compuestos relacionados a éste, la afectación de la respiración de los fungicidas no es sistémica. Por el contrario, los procesos de biosíntesis que afectan parecen generalmente tener las propiedades sistémicas (Sijpesteijn, 1982).

Entre los mecanismo de resistencia más conocidos tenemos: la modificación bioquímica del sitio de acción para que sea menos sensible; el cambio en la ruta metabólica alternativa para evitar el sitio de acción y la alteración del mecanismo metabólico para excluir al fungicida.

El mecanismo más común parece ser una modificación bioquímica al sitio de acción del fungicida. Esto podría explicar, el por qué en muchos de los productos más viejos, no se han encontrado problemas de resistencia. Una vez que ellos han penetrado la célula micótica, los fungicidas más viejos actúan como inhibidores generales de enzima, afectando muchos sitios de acción (de aquí en adelante ellos son llamados a veces "multi -sitio" inhibidores). Estos actúan selectivamente en hongos, antes que en plantas y animales, porque penetran y se acumulan mucho más ágilmente en hongos. Muchos sitios en el hongo tendrían que cambiar para detener simultáneamente el trabajo del fungicida. Los casos esporádicos de la resistencia multi.-sitios de los fungicidas han resultado presumiblemente de otros tipos de mecanismo, no implicando los sitios de la acción (Brent, 1995).

Por contraste, la mayor parte de los fungicidas modernos parecen actuar principalmente en un solo sitio de acción, y a menudo se refieren a como fungicidas "de un solo sitio " o "sitio específico". Así apenas una sola mutación de gene puede causar alteración del sitio de acción, para llegar a ser menos vulnerable al fungicida.

El desarrollo de resistencia a un fungicida se debe a cambios en la célula de hongo que impide al fungicida llegar al sitio de acción Ejemplos de estos cambios fueron descritos en forma separada en 1995 por: Dekker, Brent y Siesler:

- Reducción en la permeabilidad de la membrana del protoplasto al fungicida. Esta alteración impide que el fungicida alcance el sitio de reacción disminuyendo el control de la enfermedad.
- Disminución de la afinidad del fungicida con el sitio de reacción del hongo. Esta se da por una simple mutación del gen relacionado con el sitio bioquímico de acción alterándolo, haciéndolo así menos vulnerable al fungicida.
- Poca o muy baja acumulación del fungicida en la célula.
- Conversión a un compuesto inactivo (detoxificación)
- Ausencia de conversión a un compuesto fungitóxico.
- Compensación, se presenta cuando un organismo sensible cambia tan drásticamente su metabolismo, que llega a requerir una menor cantidad del compuesto fungitóxico. También se puede presentar una sobreproducción de la enzima responsable de la reacción en el sitio activo.

2.4.3 Factores que influyen en el desarrollo de la resistencia

Son muchos los factores que afectan el desarrollo de la resistencia, lo cual hace muy difícil predecir el riesgo de resistencia para un nuevo fungicida. Entre los factores que pueden inducir resistencia se incluyen: propiedades del fungicida, biología del patógeno y sistema de producción donde se usa el fungicida.

- **Propiedades del fungicida:** el tipo de fungicida y modo de acción son factores que deben considerarse. Según Brent, los fungicidas de acción múltiple que intervienen en muchos procesos metabólicos del hongo y que son usualmente de actividad protectante, son considerados de bajo riesgo para el desarrollo de resistencia. Por el contrario, los fungicidas de modo de acción específica son considerados de alto riesgo, debido a que, con una simple mutación que se dé en el genoma del patógeno, se podría provocar una alteración en el sitio de acción.

- **Biología del patógeno:** los hongos con altas tazas de reproducción son más propensos al desarrollo de la resistencia a los fungicidas. En el caso de *M. fijiensis*, éste todavía es más complejo, ya que posee reproducción sexual y asexual. El aporte dado por los dos componentes de la sexualidad le permite, por recombinación

genética, ganar variabilidad rápidamente. Esto ha señalado un aporte importante a su heterotalismo propio.

- **Sistema de producción donde se usa el fungicida:** las prácticas de producción que favorecen el incremento de la presión de la enfermedad también promueve el desarrollo de la resistencia, por el incremento en el número de individuos expuestos a la presión de selección (Dekker, 1982). La inadecuada fertilización con nitrógeno puede incrementar la incidencia de una enfermedad en ciertos cultivares. También, las prácticas de sanidad mal realizadas pueden convertirse en otra causa del desarrollo de la enfermedad.

2.4.3 Algunos fungicidas sistémicos de uso frecuente

Los fungicidas han sido utilizados para proteger a las plantas contra el ataque de enfermedades causadas por hongos. Desde sus inicios, principalmente para la protección de semillas de cereales y cultivos de uvas para vino, la gama de químicos disponibles, el área y frecuencia de su uso y la efectividad de los tratamientos, se han incrementado enormemente, especialmente desde la segunda guerra mundial (Brent 1995).

Desde entonces, el uso de químicos se ha convertido en una importante herramienta para el manejo y control de las enfermedades. Pero en años recientes, estas tecnologías han sido blanco de fuertes críticas por parte del público y la comunidad científica, quienes se oponen al desarrollo de estos compuestos. Algunos gobiernos ya han realizado campañas en contra de la formulación y registro de los fungicidas. Además, la falta de educación apropiada en los agricultores; y la más importante de todas, el desarrollo de resistencia de muchos patógenos hacia los fungicidas, son situaciones que dificultan la creación y desarrollo de estos compuestos (Gangawane 1997).

En la década de 1970, fueron muy esporádicos los casos de resistencia a fungicidas, los cuales ocurrieron muchos años después de que éstos fueran empleados comercialmente. Con la introducción de los fungicidas sistémicos, la incidencia de resistencia incrementó grandemente y el tiempo requerido para que el patógeno desarrollara la resistencia se hizo relativamente más corto (Brent 1995).

La tabla 1, resume la historia de la aparición de resistencia en algunos de los mayores grupos de fungicidas empleados en el mundo. Como el benomil fue introducido desde 1971, es sobre este producto donde se ha reportado el mayor número de casos de resistencia de patógenos. Luego del benomil, fueron apareciendo nuevos casos, la mayoría de ellos encontrados sobre fungicidas sistémicos (Gangawane 1997).

Tabla 1: Cronología de la resistencia a los principales grupos de fungicidas utilizados en el mundo (Tomado de Brent 1995).

Aparición en el mercado	Fungicida o clase de fungicida	Años de uso comercial antes de observarse resistencia	Principales patógenos afectados
1960	Hidrocarbonos aromáticos	20	*Penicillium* spp
1964	Organo-mercurados	40	*Pyrenophora* spp
1969	Dodine	10	*Venturia inaequalis*
1970	Benzimidazoles	2	Muchas enfermedades y patógenos
1971	2-Amino pirimidinas	2	*Sphaerotheca fuliginea* y *Erysiphe graminis*
1971	Kasugamycin	6	*Magnaporthe grisea*
1976	Phosphorothiolates	9	*Magnaporthe grisea*
1977	Triphenyltins	13	*Cercospora betae*
1980	Fenilamidas	2	*Phytophthora infestans* y *Plasmopara viticola*
1982	Dicarboximidas	5	*Botrytis cinerea*
1982	Inhibidores de la dimetilación del esterol (DMIs)	7	*Sphaerotheca fuliginea* y *Erysiphe graminis*
1985	Carboxanilidas	15	*Ustilago nuda*

Cabe destacar, que debido al riesgo de desarrollo de resistencia que presentan algunos fungicidas, principalmente los sistémicos, es necesario que se tomen medidas antiresistencia

para proteger a estos químicos (Chin *et. al.* 2001). Para ello es necesario la aplicación de sistemas de monitoreo de sensibilidad, los cuales consisten en: (1) levantar datos para poder establecer una línea base de sensibilidad del patógeno al nuevo fungicida; (2) la detección prematura de cualquier cambio hacia la resistencia por parte del patógeno; (3) contrastar evidencia del efecto que tienen los programas de aplicación del fungicida sobre la sensibilidad del patógeno y (4) evaluar la eficacia de los diferentes programas de aplicación de fungicidas como una medida antiresistencia (Bayles et. al. 2001).

2.4.3.1 Resistencia a Benzimidazoles

Los benzimidazoles pertenecen al grupo de los fungicidas sistémicos y abarca varios compuestos, de los cuales el benomil ha sido uno de los mayormente usados en América Central. Este grupo de fungicidas actúa en la prevención de la formación del microtubulo (fibra del uso), el cual es necesario para la división celular en la mitosis y la meiosis. Ellos enlazan la β-tubulina, que es una proteína importante en la composición del microtubulo (Jones 2000).

Desafortunadamente, este grupo fue formulado unos diez años después de haberse desarrollado resistencia a esta clase de fungicidas. Para ese tiempo, muchos de los grandes grupos de patógenos ya habían evolucionado hacia poblaciones con marcada resistencia, las cuales eran de 100 a 500 veces menos sensitivas que las originales. Este hecho fue atribuido a serios problemas en el control de las enfermedades que ya estaban presentes en muchos cultivos en muchas ciudades. El grado de resistencia desarrollado dependió grandemente de la presión de la enfermedad y la intensidad del uso de los benzimidazoles (Brent 1995).

La resistencia de *Mycosphaerella fijiensis* al benomil fue reportada en Honduras en 1977, después de dos a tres años de uso continuo del producto (Romero y Sutton 1998). La adquisición de resistencia de este patógeno hacia el benomil ha sido atribuida al uso intensivo de los benzimidazoles para el control de la enfermedad. Un solo cambio en el gene de la β-tubulina, en *Venturia ineaqualis* y otros hongos patógenos, resultó en la resistencia a los benzimidazoles. Esta fue, probablemente, la misma mutación que ocurrió en *Mycosphaerella fijiensis* (Jones 2000).

Brent (1995), considera que, en el caso de la enfermedad de Sigatoka negra, le resistencia a los benzimidazoles dentro de los campos de cultivo, declina después de abandonar su uso durante un periodo de tiempo razonable. Sin embargo, Romero y Sutton (1998) realizaron estudios en plantaciones de banano en Costa Rica, encontrando resistencia del patógeno en fincas donde se había utilizado benomil durante diez años o más e incluso en aquellas donde se había abandonado su uso desde hace más de cinco años.

2.4.3.2 Resistencia a Propiconazole

Otro de los grupos de fungicidas sistémicos más usados es el de los propiconazoles. A este grupo pertenecen los triazoles, dentro de los cuales hay un gran número de productos disponibles para el manejo de enfermedades, sobre todo para el cultivo del banano. El modo de acción de este grupo consiste en inhibir la enzima citocromo P-450 mono-oxigenaza, la que cataliza la reacción de demetilación del C-14, en la biosíntesis del ergosterol. De allí que estos fungicidas sean conocidos como inhibidores de la demetilación, DMIs por sus siglas en inglés (Jones 2000).

Los DMIs fueron usados por primera vez en los años de la década de 1970, existiendo muy pocos productos dentro de este grupo. Desde entonces, más de treinta DMIs han sido utilizados en la agricultura. Para los años de 1980, fueron muy pocos los reportes que documentaron casos de resistencia hacia estos fungicidas (Brent 1995).

En los últimos años, se han realizado muchos estudios que tuvieron como finalidad, identificar especies de hongos patogénicos con algún nivel de resistencia desarrollada hacia este grupo de fungicidas. Por ejemplo, Karaoglanidis et. al. (2002), a partir de ensayos realizados con muestras provenientes de fincas con una historia de uso de los DMIs, al norte de Grecia; encontraron que la sensibilidad de *Cercospora beticola* se había reducido significativamente. Este comportamiento se atribuye al hecho de que las aplicaciones de DMIs fueron aumentando en frecuencia durante un periodo comprendido entre los años de 1996 a 1999

Igualmente, en los viñedos austríacos se realizaron pruebas para medir el nivel de sensibilidad de *Uncinula necator* a los DMIs. Durante los años de 1995 a 1996, estos fungicidas lograron un excelente control de las poblaciones del hongo, pero a partir de los

años siguientes, 1996 a 1998, el patógeno mostró una reducción de sensibilidad a todos los DMIs probados. Todas las muestras presentaron resistencia cruzada a los DMIs probados, llegando en algunos a casos a niveles de resistencia muy altos (Steinkellner y Redl 2001).

De la misma forma, estudios realizados con poblaciones de *Rhynchosporium secalis* (Robbertse et. al. 2001) y *Blumeria graminis* (Klem 2000), demostraron altos niveles de resistencia de estos hongos hacia fungicidas del grupo de los propiconazol.

Publicaciones de Romero y Sutton (1998), indican que para inicios de la década de los años 90, la resistencia de *Mycosphaerella fijiensis* a benomil ya había sido detectada en las plantaciones de banano de Costa Rica. Este hecho condujo a un aumento en el uso de los propiconazoles, hasta que finalmente para los años de 1994 y 1995, la resistencia de *Mycosphaerella fijiensis* a estos productos estaba claramente establecida (Guzmán y Romero 1997).

2.4.3.3 Resistencia a Azoxistrobina

Las azoxistrobinas, pertenecientes al grupo de las estrobirulinas, son un nuevo grupo de fungicidas sistémicos con un modo de acción específico. Este consiste en la inhibición del transporte de electrones en la respiración mitocondrial al sitio Q_o del citocromo del complejo bc_1 (III complejo, Q-citocromo C reductasa) (Chin *et al* 2001).

Las estrobilurinas son compuestos que ocurren en la naturaleza y son producidos por el hongo *Strobilorum tenacellus*, de allí su nombre. Los primeros compuestos pertenecientes a este grupo fueron encontrados en los hongos necrófagos que viven en el material en descomposición de los bosques (Clough 1992; Lange 1993; citados por Guzmán y Romero 1997).

El modo de acción específico de estos fungicidas impone un alto riesgo al desarrollo de resistencia. En varios mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, la substitución de aminoácidos dentro del citocromo b, sitio de ataque de las estrobirulinas, fue suficiente para que se redujera la sensibilidad del patógeno hacia el fungicida. Un mecanismo de acción similar fue reportado para organismos naturalmente tolerantes a las estrobilurinas (Olaya y Köller 1999).

A la fecha, ya se han reportado algunos casos de resistencia en hongos fitopatógenos como *Podosphaera fusca* y *Pseudoperonospora cubensis* (Ishii et al. 2001); en *Blumeria graminis* f.sp. tritici, donde la mutación resultó en el reemplazo de una glicina por un residuo de alanina en el codon 134 (G134A) en el gen b del citocromo mitocondrial (Fraaije et al. 2002) y en *Venturia inaequalis*, donde la pérdida de sensibilidad de este hongo solo fue comprobada *in vitro*, mas no así *in vivo* (Olaya y Köller 1999).

En 1996, el fungicida Bankit®, perteneciente a la azoxistrobina, fue la primera estrobilurina registrada para su uso comercial en el cultivo de banano en América Central a una dosis recomendada de 100 gramos de ingrediente activo por hectárea (Jones 2000).

A pesar de su reciente aparición en el mercado, ya se han reportado casos de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* resistentes a este producto, donde el hongo ha demostrado una resistencia cruzada a varios fungicidas pertenecientes al grupo de las estrobilurinas (Chin *et al.* 2001; Sierotzki et al. 2000; comunicación personal Florez, 2002).

2.5 *Estrategias para el manejo racional del cultivo*

2.5.1 Control químico

Todo parece indicar, que el desarrollo de resistencia se debe principalmente al uso de fungicidas con un mecanismo específico de acción. Por eso, se hace necesario implementar estrategias de manejo que permitan un uso adecuado de estos agroquímicos, asegurando de esta manera, la efectividad del producto y su permanencia prolongada en el mercado.

Brent (1995) propone la siguiente estrategia de manejo, como una alternativa efectiva que puede ayudar a impedir el desarrollo de resistencia de los patógenos hacia los fungicidas. Esta considera seis puntos y aunque ellos son discutidos individualmente, su uso integrado es factible y beneficioso.

1. No usar el producto en aislamiento. Se debe aplicar con uno o más fungicidas de tipo diferente, o uno o más componentes en rotación o alternancia de diferentes tratamientos.

El uso combinado de los fungicidas con diferente mecanismo de acción diluirá la presión de selección ejercida por el fungicida en riesgo e inhibe el crecimiento de cualquier biotipo resistente que se presente.

2. Restringir el número de tratamientos aplicados por temporada y aplicar solo cuando sea estrictamente necesario. Use otros fungicidas subsecuentemente. Estrategias como la rotación, reducen el número total de aplicaciones del fungicida en riesgo y, por lo tanto, debiera desacelerar la presión de selección en algún grado. Sin embargo, los tratamientos, los cuales están siendo consecutivamente aplicados, generalmente coinciden con los estados más activos de la epidemia cuando la presión de selección está en su nivel más alto. Así, cualquier retraso en la resistencia puede no ser proporcional a la reducción en el número de aplicaciones. Por otro lado, la interrupción de la aplicación a tiempo del fungicida, cuando el patógeno se está multiplicando, puede permitir un resurgimiento positivo de más formas sensibles.

3. Aplicar solo las dosis recomendadas. Por muchos años, los agricultores han usado dosis reducidas del fungicida en condiciones donde la presión de la enfermedad es baja. Es una visión firme de la FRAC (The Fungicide Resistance Action Committe), que las dosis recomendadas debieran ser mantenidas, no solo porque ellas mantienen la incorporación del factor seguridad y garantizan los niveles de rendimiento demandados bajo un amplio margen de condiciones, pero más particularmente porque la reducción de las dosis pueden conducir al desarrollo de la resistencia.

4. Evite el uso de erradicantes. Una de las ventajas de los fungicidas sistémicos es que ellos pueden erradicar infecciones existentes. Es por esta propiedad que debieran ser usados únicamente sobre umbrales básicos, donde las aplicaciones son hechas solo cuando son seguras, económicamente aceptables, existen niveles críticos de la enfermedad o por prevenir futuras aspersiones.

5. Diversidad química. La disponibilidad de diferentes tipos de fungicidas para el control de cada una de las principales enfermedades de los cultivos es altamente beneficioso, pues contribuye a mantener la calidad del ambiente y a resolver los problemas de resistencia. El uso continuo de uno o muy pocos tipos de componentes por muchos años, representa un gran riesgo y favorece la aparición de la resistencia en los organismos patogénicos.

2.5.2 Manejo integrado de la enfermedad.

El uso integrado de todo tipo de medidas contra el desarrollo de enfermedades en los cultivos, no es solo deseable sobre argumentos económicos y ambientales, también es la mejor estrategia que se conoce para evitar la resistencia a los fungicidas. El uso de variedades resistentes a las enfermedades, agentes de control biológico y prácticas culturales apropiadas tales como la rotación de cultivos y la remoción de las partes enfermas de la planta en cultivos perennes, reducen la incidencia de la enfermedad y permite un menor uso de los fungicidas. Todo esto impide la selección de formas del patógeno resistentes a los fungicidas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 *Ubicación del experimento*

El estudio se llevó a cabo en el distrito de Barú, provincia de Chiriquí, República de Panamá. Esta zona posee costas en el Pacífico y está ubicada en la parte sur occidental de la república, siendo un área limítrofe con Costa Rica.

El distrito de Barú tiene una superficie de 60,910 hectáreas y políticamente está dividido en tres corregimientos: Limones, Progreso y Puerto Armuelles; siendo este último la cabecera del distrito. El cultivo del plátano es la actividad agrícola de mayor importancia en la zona y se practica a lo largo de todo el distrito, pero en los corregimientos de Progreso y Puerto Armuelles, es donde se registra el mayor área cultivada, existiendo un total de 18 comunidades dedicadas a su producción.

Las fincas seleccionadas a partir de las cuales se tomaron las muestras de material vegetal, están ubicadas en el corregimiento de Progreso, específicamente en las comunidades de San Bartolo, Cedro y Corotú (Ver anexo 4).

3.2 *Definición de la población y muestra*

Para el estudio se escogieron fincas con un historial de aplicación de fungicidas de cinco años o más y fincas donde nunca se había practicado ningún tipo de tratamiento químico para el combate de la Sigatoka negra. Esto permitió obtener poblaciones *de M. fijiensis* que han estado en forma constante, bajo la aplicación de los programas de tratamiento químico para el control de la enfermedad (llamadas de ahora en adelante población tratada) y poblaciones de *M. fijiensis* que nunca han estado bajo la presión de los fungicidas (llamadas de ahora en adelante población silvestre).

Con base en lo anterior, las comunidades de Cedro y Corotú fueron seleccionadas como las áreas de donde se obtuvo la población tratada y la comunidad de San Bartolo para la población silvestre. Dentro de cada una de ellas, fue escogida solamente una finca de donde

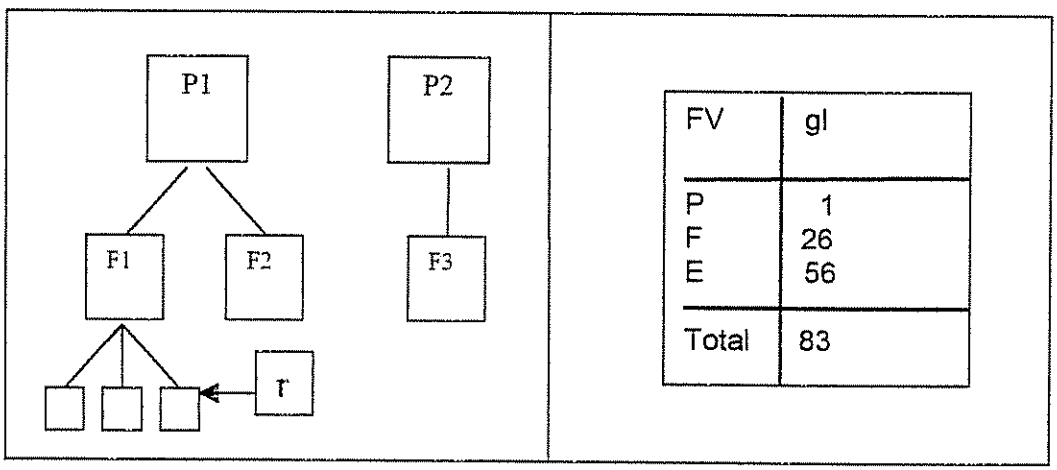
se extrajo la muestra de material vegetal a la cual se le identificó con el mismo nombre de la comunidad.

Cada una de las fincas abarcaban una superficie no mayor a una hectárea y se procuró que éstas estuvieran lo más distantes posible entre sí, asegurando de esta manera, que las poblaciones del hongo fueran genéticamente diferentes y que ninguna de ellas estuviera influenciada por las demás. En el caso de la población silvestre, fue un requisito la no existencia de fincas vecinas en donde se aplicaran fungicidas sistémicos.

3.3 *Diseño experimental*

El modelo estadístico que se aplicó fue un diseño jerárquico, donde el factor primario corresponde a las dos poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* (tratadas y no tratadas con fungicidas). El factor secundario serían los productos químicos (fungicidas) y el tercer factor lo son las diferentes dosis aplicadas por cada fungicida.

Los tratamientos consistieron en la aplicación de diferentes dosis de los fungicidas Tilt, Benlate y Bankyt. De Tilt se aplicaron cinco dosis, mientras que de Benlate y Bankyt solo se aplicaron cuatro. Esto nos suma un total de 13 tratamientos por muestra más el control (14 en total).



FV	gl
P	1
F	26
E	56
Total	83

Figura 7: Esquema del diseño experimental a utilizar. P: población, F: finca, r: repetición (izquierda) y cuadro de grados de libertad (derecha).

3.4 *Modelo matemático*

El modelo matemático es el aditivo lineal, el cual describe el comportamiento de las variables de respuesta. Cada una de las fuentes de variación dentro del diseño jerárquico fueron identificadas así: P: producto; D: Dosis de fungicida.

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + E_{ij} + D_k + D/P_{ik} + E_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijk}: variable de respuesta (porcentaje de inhibición de ascosporas, diámetro de las colonias).

μ: media general

P_i: efecto de los fungicidas comerciales (j): 1, Tilt; 2, Benlate y 3 Bankyt.

E_{ij}: error de fungicida.

D_k: efecto de las concentraciones de cada uno de los fungicidas.

D/P_{ik}: efecto de la interacción dosis por fungicida.

E_{ijk}: error de concentración e interacción dosis por fungicida.

E_{ijkl}: error del experimento

3.5 *Recolección de material vegetal*

El tamaño reducido de las fincas permitió tomar muestras, de casi la totalidad de las plantas dentro de cada plantación; y ésta consistió en partes de tejido foliar lesionado por la enfermedad, que se encontraban en estados avanzados de la misma (estados 5 y 6). Justo en esos estados, es cuando están presentes las estructuras reproductivas (peritecios) del hongo.

La recolección del material vegetal se realizó preferiblemente, después de 2 a 3 días sin lluvias, para asegurar la presencia del inóculo en el tejido foliar. Las muestras se colectaron en bolsas de papel, dentro de las cuales fueron trasladadas al laboratorio. Una vez allí, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas, con el objetivo de reducir la proliferación de hongos contaminantes.

Transcurrido este tiempo, se cortaron varios segmentos del material infectado (con lesiones en fase esporulante) de aproximadamente 2 cm de diámetro, provenientes de cada una de las fincas. Estos fueron adheridos con grapas metálicas a láminas de papel bond de 15 x 15 cm (4 segmentos por lamina), con la superficie adaxial expuesta. Posteriormente, fueron incubados a temperaturas entre 26-28°C, por un período de 24 a 48 horas y a una humedad relativa de 98-100%. Bajo estas condiciones se pretendió promover la maduración de estructuras reproductivas y aumentar la descarga de ascosporas.

3.6 *Descargas de ascosporas*

Ya incubados, los segmentos de muestra vegetal adheridos al papel bond, fueron sumergidos en agua destilada durante cinco minutos para hidratar los peritecios y facilitar la liberación de las acosporas sobre los platos de Petri. Estos platos contenían medio agar-agua al 2% (Bacto Agar Difco) con las diferentes concentraciones de los fungicidas (tratamientos) que serían aplicadas a las poblaciones del hongo. Cada concentración fue vertida en 3 platos Petri diferentes.

Los segmentos fueron colocados sobre los platos Petri de tal manera, que la superficie expuesta de la muestra quedó sobre el medio con fungicida, permitiéndose una caída directa de la ascospora sobre el medio. Estos permanecieron allí durante 60 minutos para luego ser retirados de encima del plato, los cuales fueron inmediatamente sellados con cinta parafilm e introducidos en la incubadora. Los platos con descargas se incubaron durante 48 horas a 25°C en la oscuridad, para posteriormente evaluar la reacción ante el fungicida en cuestión.

Pasado este tiempo, se procedió a medir con un microscopio de luz, a 10 X, marca Olympus, modelo CH-2, CH-B 145-2; la longitud del tubo germinativo de 150 ascosporas que se

Pasado este tiempo, se procedió a medir con un microscopio de luz, a 10 X, marca Olympus, modelo CH-2, CH-B 145-2; la longitud del tubo germinativo de 150 ascosporas que se desarrollaron en cada una de las concentraciones de los fungicidas propiconazole, benomil y azoxistrobina, tratando de realizar 50 lecturas por cada plato Petri.

Las concentraciones para Agar propiconzole (Tilt 25 CE) fueron: 0,0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 y 1,0 mg L^{-1}. Para los fungicidas benomil (Benlate 50 Polvo soluble) y azoxistrobina (Bankyt 25 SC) se utilizaron las siguientes: 0.1, 1.0, 5.0 10.0 mg L^{-1}. Los anexos 1, 2 y 3, indican la forma en que se calibraron estas soluciones, según condiciones estándar de preparación establecidas en el laboratorio de fitopatología de CORBANA S.A. en Costa Rica.

Debido a que el Benomil tiene un efecto directo en el desarrollo del tubo germinativo de la ascospora y para una mejor evaluación de su efecto sobre este; las ascosporas de *M. fijiensis* que crecieron bajo las distintas concentraciones de este fungicida, fueron separadas en cuatro categorías: 1. Esporas sin tubo germinativo (NG); 2. Esporas con tubos germinativos cortos, inferiores a 50 micras (TC); 3. Esporas con tubos germinativos distorsionados (TD) y 4. Esporas con germinación normal, tubos superiores a 50 micras (GN).

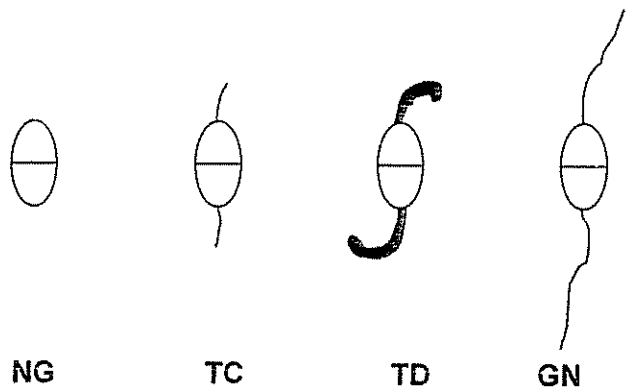


Figura 8: Formas a considerar de las ascosporas de *M. fijiensis* tratadas con el fungicida benomil. NG = no germinadas; TC= con tubos germinativos cortos (menos de 50 micras); TD= con tubos germinativos distorsionados y GN= germinación normal (tubos germinativos mayores a 50 micras).

La lectura del largo del tubo germinativo de las ascosporas se realizo en transectos imaginarios dentro del plato, evitando aquellas zonas infectadas con esporas de otros hongos contaminantes o aquellas zonas muy densas donde se dificultaba la lectura.

3.7 *Aislamientos monoascospóricos*

De las ascosporas que fueron descargadas sobre los medios que no contenían fungicida, se escogieron aleatoriamente, 20 de ellas por sitio de muestreo o finca. Estos aislamientos monoascospóricos fueron transferidos, en grupos de diez, a platos Petri (100 x 15 mm) previamente preparados con medio papa dextrosa agar (PDA Bacto, Difco Laboratories). Luego de 7 días de incubación a 26°C y en la oscuridad, se formaron pequeñas colonias del hongo, las cuales fueron transferidas, en grupos de cuatro, a platos Petri (100 x 15 mm) que contenían el medio PDA.

Colocadas en los platos, las colonias fueron posteriormente incubadas por 15 a 20 días en la oscuridad a 26°C, lográndose estimular el crecimiento micelial. Transcurrido este tiempo y en una cámara de flujo laminar, cada colonia fue colocada en un tubo de ensayo con 3 ml de agua desionizada estéril, más 0,05% de Twen 20 y se agitó vigorosamente en un agitador de vórtice para desprender partes del micelio. Luego se tomó una alícuota de 0,25 ml con pipeta de Pasteur (aproximadamente 10 gotas) de esta suspensión de partes de micelio y, con un asa de vidrio, se distribuyó sobre la superficie del medio contenido en los platos Petri (100 x 15 mm), inoculando 3 platos por cada colonia. Los platos se incubaron por 7 días a 24°C, con luz continua para estimular la esporulación conidial.

Pasados los siete días, se tomaron de 10-15 colonias y se colocaron en tubos de ensayo con 3 ml de agua desionizada estéril, más Tween 0,05% y se agitaron con el agitador de vórtice para suspender los conidios en el agua. De esta suspensión se tomaron 0.05 ml (aproximadamente dos gotas) con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre platos de Petri que contenían PDA con las diferentes concentraciones de los fungicidas. Estos platos se incubaran a 26°C en la oscuridad por 5 días. Transcurrido este tiempo, se medió el diámetro de 10 colonias por cada concentración en un microscopio de luz a 4X.

Con el propósito de reducir la variabilidad en el tamaño de los segmentos de micelio que fueron depositados sobre el medio PDA con las diferentes dosis de los fungicidas; se prepararon tamices a base de gasas que hicieron posible filtrar la suspensión conoidal y obtener un tamaño casi uniforme de los conidios, a partir de los cuales se formaron las colonias.

Para medir el diámetro de las colonias, fue necesario seleccionar a aquellas colonias que presentaban un tamaño promedio (el más frecuente) dentro del plato y descartar a aquellas con medidas o diámetros muy por encima o por debajo de ese tamaño medio. Al momento de realizar la lectura al microscopio, solo fueron consideradas diez de las colonias previamente seleccionadas.

3.8 *Análisis de laboratorio*

3.8.1. Sensibilidad de las ascosporas

La sensibilidad de las ascosporas a los fungicidas propiconazole y azoxistrobina, se determinó comparando la longitud del tubo germinativo (TG), de las ascosporas que se descargaron en los medios con fungicida, contra el de las que se descargaron sobre el medio sin producto (testigo).

El promedio de la longitud del TG de las ascosporas descargadas en los medios sin fungicida, se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo de cada una de las ascosporas en los medios con fungicida. Con esta información se estimó el porcentaje promedio de inhibición del desarrollo del TG, para cada concentración y en cada uno de los fungicidas analizados. Con estos valores se obtuvo el valor de la Concentración Efectiva Media (CE_{50}) por medio de regresión lineal del logaritmo natural de la concentración del fungicida contra el porcentaje de inhibición del TG.

Para el fungicida azoxistrobina, existía la posibilidad de que las esporas que se descargaron sobre las concentraciones más altas de este producto, no presentaron germinación. En este caso, la inhibición en el desarrollo del tubo germinativo se consideró como de un 100%. Por tal razón, se hizo una separación adicional del porcentaje de ascosporas en cada una de las siguientes categorías: 1) Ascosporas sin germinar; 2) con TG < 50 micras; 3) TG > 50 y hasta 100 micras; 4) con TG > 100 micras y hasta 150 micras y 5) con TG > 150 micras. Mientras que para el benomil, se estableció el porcentaje de ascosporas en cada una de las categorías indicadas anteriormente en la figura 8.

3.8.2. Sensibilidad de aislamientos monoascospóricos

Con el diámetro de las colonias que crecieron en el medio sin fungicida, se calculó el porcentaje de inhibición en el crecimiento de las colonias que se desarrollaron sobre cada concentración. Con estos valores se calculó la CE_{50} de cada fungicida, por medio de regresión lineal del logaritmo natural de la concentración de fungicida, contra el porcentaje de inhibición en el crecimiento de las colonias.

3.9 *Análisis estadístico*

Utilizando el programa estadístico SAS, versión 8, las pruebas de normalidad fueron aplicadas para comprobar la existencia de diferencias entre los promedios de crecimiento de tubo germinativo de las ascosporas de cada finca, por fungicidas y para cada una de las dosis utilizadas. Esta prueba solo fue necesaria para los fungicidas propiconazole y azoxistrobina.

Para el caso del benomil; y debido a que las respuestas en el crecimiento del tubo germinativo a este fungicida fueron clasificadas en las categorías ya mencionadas; la prueba de Chi Cuadrado (X^2) permitió hacer comparaciones entre fincas, por categorías de crecimiento de tubo germinativo y por cada una de las dosis utilizadas del fungicida. La misma prueba fue aplicada para las categorías de respuesta del fungicida azoxistrobina.

En el caso del crecimiento del tubo germinativo de las ascosporas, también fue necesario hacer pruebas de comparación de pendientes, para poder determinar diferencias en las CE_{50} de cada una de las fincas. En el caso de crecimiento de colonias, las diferencias en las CE_{50} se obtuvieron a través de un análisis de varianza y de pruebas de contrastes entre fincas tratadas y no tratadas. Para el fungicida benomil, las pruebas de diferencias de CE_{50}, solo se aplicaron para el crecimiento de colonias.

El porcentaje de pérdida de sensibilidad para cada uno de los fungicidas, fue calculado en base a la relación que existió en cada concentración, entre el porcentaje de inhibición del testigo y las fincas tratadas. Dicho calculó se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%P.S. = \frac{\text{Check - tratamiento}}{\text{Check}} * 100$$

%P.S.: Porcentaje de pérdida de sensibilidad.

Check: porcentaje de inhibición del testigo

Tratamiento: porcentaje de inhibición de las fincas tratadas.

Fuente: Ing. M Guzmán

El factor de resistencia fue estimado utilizando los valores de las CE_{50} (para el caso de propiconazole) y de las Ce_{75} (para azoxistrobina y benomil). Se tomó a nuestra finca silvestre como la población de referencia a partir de la cual se calcularía dicho factor, el cual se interpreta como el cociente del valor de CE_{50} o el de la CE_{75} de las fincas tratadas y el de la finca no tratada.

$$FR = \frac{CE_{50\ ó\ 75}\ \text{finca tratada}}{CE_{50\ ó\ 75}\ \text{finca no tratada}}$$

La interpretación de los resultados obtenidos de esta operación se realizó de la siguiente forma:

FR>1: existe pérdida gradual de sensibilidad al fungicida por parte del patógeno.

FR<1: El patógeno de la finca tratada tiene el mismo nivel de sensibilidad que el de la finca no tratada.

Fuente: Ing M. Guzmán.

También se utilizó un programa en Excell elaborado por el Ing Mauricio Guzmán, coordinador del laboratorio de Fitopatología de CORBANA. S.A, Costa Rica, el cual nos permitió, a través de tres procedimientos, calcular el porcentaje de inhibición, la CE_{50} y el Factor de Resistencia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 *Propiconazole*

Se pudo observar, que al aumentar la concentración de la dosis del fungicida propiconazole (Tilt®), la longitud en el crecimiento del tubo germinativo de las ascosporas de las tres fincas analizadas se fue reduciendo de manera gradual. Este hecho puede ser explicado al considera el modo de acción del propiconazole, el cual actúa en la inhibición de la biosíntesis del ergosterol, componente importante de la pared celular. Es posible que a medida que la concentraciones de la dosis del fungicida van aumentando, el proceso sea más inhibido; a tal nivel, que la ascospora no logra la formación de una pared celular que asegure la supervivencia de cada una de las células que forman el tubo germinativo, no logrando éste, un mayor desarrollo.

Las pruebas de análisis de varianza indican que estadísticamente, hay diferencias entre las respuestas a las dosis del fungicida propiconazole; sin embargo, para la dosis 0.0001 mg L^{-1}, éstas diferencias solo pudieron ser detectadas cuando se compararon a las poblaciones de Cedro (tratada) con San Bartolo (no tratada - $P< 0.0106$). El mismo comportamiento se observó cuando las poblaciones estuvieron bajo el efecto de la dosis 0.001 mg L^{-1} ($P<0.0007$). A la dosis 0.01 mg L^{-1} existieron diferencias entre las poblaciones tratadas contra la no tratada ($P< 0.0001$); no obstante, para la dosis 0.1 mg L^{-1} las diferencias fueron marcadas y estadísticamente significativas entre las tres fincas ($P<0.0001$) y además, los valores promedios de la zona tratada manifiestan esta diferencia frente a la zona no tratada. Para la dosis 1.0 mg L^{-1}, la respuesta a los tratamientos fue similar que a la dosis de 0.01 mg L^{-1} ($P< 0.0007$).

Los resultados obtenidos en porcentaje de inhibición, tampoco demuestran diferencias entre las poblaciones de las tres fincas, excepto para la dosis 0.1, donde las diferencias estadísticas fueron significativas, en cuanto a la sensibilidad (tabla 2). En el gráfico que ilustra éstos resultados (figura 9) se puede observar como en la población de San Bartolo, un gran número de ascosporas (109 de 150 ascosporas) presentaron niveles de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo superiores al 50%; e incluso, un grupo menor de ellas (36 de 150 ascosporas) tuvieron una inhibición superior al 70%.

Tabla 2: Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo del tubo germinativo de ascosporas, bajo el efecto de las diferentes dosis del fungicida propiconazole.

Zona / finca	Concentración de propiconazole (mg L^{-1})				
Tratada	**0.0001**	**0.001**	**0.01**	**0.1**	**1.0**
Cedro	25.95	29.26	39.27	49.78	79.96
Corotú	14.23	26.85	31.31	55.43	81.13
Promedio + D.E.	20.09 ± 17.31	28.06 ± 19.13	35.29 ± 13.97	52.61 ± 14.67	80.55 ± 5.17
No tratada					
San Bartolo	14.45	27.98	39.78	66.37	78.00

Para las otras dos poblaciones, principalmente Cedro, se pudo observar que poco menos de la mitad del total de ascosporas evaluadas, respondieron al fungicida con una inhibición en el desarrollo de su tubo germinativo inferior al 50%, existiendo algunas que fueron inhibidas en menos del 10%.

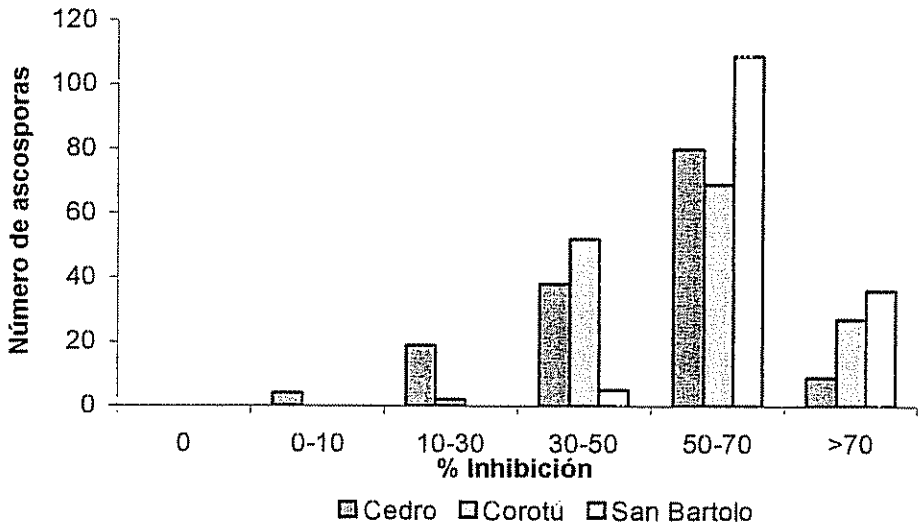


Figura 9: Número de ascosporas por categoría de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo para las poblaciones de Cedro, Corotú y San Bartolo, cuando se aplicó una dosis de 0.1 mg L^{-1} del fungicida propiconazole.

Esto refleja la existencia de ascosporas con características de pérdida de sensibilidad al fungicida propiconazole, los cuales pueden en un período de tiempo indefinido, llegar a convertirse en una fuente de inóculo y a partir de ella, formarse poblaciones del hongo más resistentes a este producto.

En cuanto a la Concentración Efectiva Media calculada en base al desarrollo del tubo germinativo de las ascosporas (CE_{50}); no se pudieron detectar diferencias

estadísticamente significativas entre ninguna de las tres poblaciones. La prueba de pendientes indica que las poblaciones evaluadas no difieren en su respuesta al fungicida propiconazole y que las tres poblaciones parecen tener el mismo grado de sensibilidad a dicho producto (Figura 10).

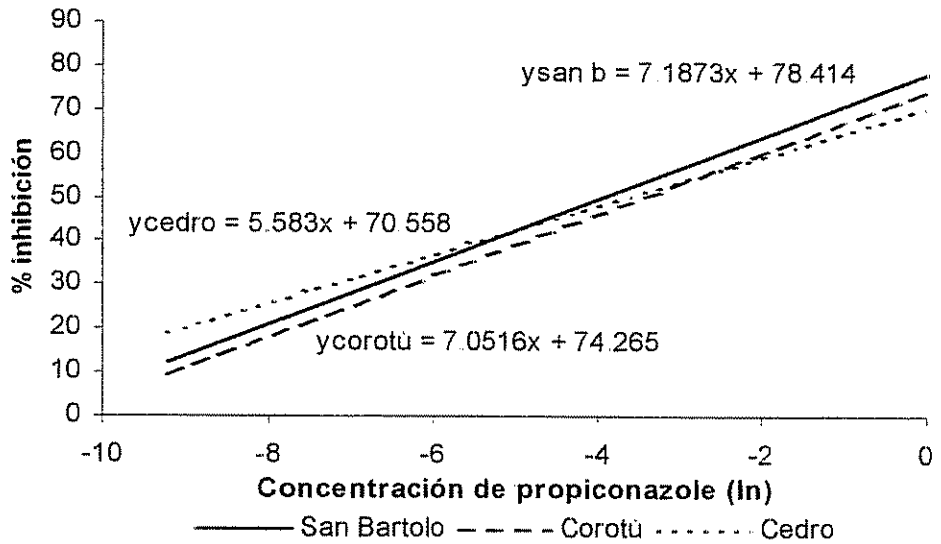


Figura 10: Comparación de pendientes lineales de regresión de las fincas de Cedro, Corotù y San Bartolo. Los valores de R^2 para cada una de las líneas de regresión son de 0.875 para Cedro, 0.9329 para Corotù y de 0.9797 para San Bartolo.

A pesar de que no hubieron diferencias estadísticas significativas, al analizar los valores de CE_{50} obtenidos para cada una de las fincas (0.02517 mg L^{-1}, 0.03203 mg L^{-1} y 0.01918 mg L^{-1} para Cedro, Corotù y San Bartolo, respectivamente), podemos evidenciar, que la población silvestre (San Bartolo) no tratada escogida, revela una CE_{50} inferior en órdenes de magnitud a las fincas de la zona tratada. No obstante, se sugiere que dada la no significancia, esta población silvestre seleccionada no sea un buen ejemplo para el establecimiento de una línea base en este fungicida estudiado.

Como se pudo observar en la figura 9, un mayor porcentaje de ascosporas y a una dosis de 0.1 mg L^{-1}, obtuvieron porcentajes de inhibición inferiores al 70%, resultados que difieren claramente de los obtenidos por Guzmán y Romero (1997) quienes observaron que las ascosporas provenientes de poblaciones consideradas como muy silvestres, eran inhibidas en su gran mayoría en más de un 70%; cifra que es tomada como base para determinar la alta sensibilidad de una ascospora al fungicida probado. Se discute la

posibilidad de que a esta población este llegando, vía diseminación por viento, fuente de inóculo externo proveniente de fincas tratadas que producen cambios o que interactuan con la población sensible existente, creando nuevas conformaciones genéticas que resisten al producto químico de control.

Lo anterior se puede considerar como válido ya que los resultados de estudios realizados por Gauhl (1992), indican que es muy posible que las ascosporas viajen largas distancias dentro de una plantación o de una plantación a otra, pues estás son favorecidas por el viento, sobre todo, pocas horas después de una lluvia cuando el número de ascosporas liberadas es mucho mayor. El mismo autor señala que la distancia de vuelo de una ascospora, es una característica determinada principalmente por la velocidad del viento y por el tiempo en que esta se expone a la luz ultravioleta de los rayos del sol; sin embargo, esta puede transportarse a largas distancias si el vuelo ocurre en horas de la noche.

En lo referente al crecimiento de colonias (reproducción asexual) del hongo, las pruebas estadísticas de comparación de pendientes, tampoco detectaron diferencias altamente significativas entre las fincas. Las comparaciones realizadas entre las CE_{50} de las poblaciones tratadas contra la no tratada, demostraron ser diferentes solo a una probabilidad del 5%. Las pocas diferencias encontradas entre las poblaciones tratadas con la silvestre, posiblemente se deba a la alta variabilidad de los datos obtenidos en las fincas de Cedro y Corotú, situación que no permite establecer en forma más clara, las diferencias existentes entre las dos zonas analizadas. Las CE_{50} promedio, obtenidas para las tres fincas estudiadas son de 2.4638 mg L^{-1}, 0.5317 mg L^{-1} y 0.0962 mg L^{-1}; para Cedro, Corotú y San Bartolo, respectivamente.

Los valores de pérdida de sensibilidad calculados para las fincas de la zona tratada (tabla 3), revelan que las concentraciones más bajas de propiconazole que fueron aplicadas a estas poblaciones, no tienen un efecto diferente al que causan en la población silvestre. Solo a las concentraciones intermedias utilizadas, donde los niveles en pérdida de sensibilidad de las fincas tratadas son de considerable importancia, se demuestra una reducción de la sensibilidad de las ascosporas provenientes de estas dos poblaciones.

Tabla 3: Valores del porcentaje de pérdida de sensibilidad, con respecto a la finca San Bartolo; al fungicida propiconazole por dosis, en las dos poblaciones tratadas evaluadas.

Finca	Concentración de propiconazole (mg L^{-1})				
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1.0
Cedro	0.0	0.0	1.28	24.99	0.0
Corotú	1.47	4.04	21.30	16.49	0.0

El propiconazole es un producto que está muy bien distribuido entre los productores de plátano de Panamá, que utilizan fungicidas sistémicos como una herramienta de control de la Sigatoka negra. Como se mencionaba anteriormente, es muy probable que la población de *Mycosphaerella fijiensis* obtenida de la finca de San Bartolo, escogida como la población silvestre o de referencia, esté influenciada en su composición genética, por individuos de poblaciones cercanas que sí han estado bajo tratamiento químico basados en el propiconazole y que sea debido a eso, que este producto tiene el mismo efecto en las tres poblaciones, sin permitirnos detectar diferencias estadísticas entre ellas. No obstante, las diferencias en sensibilidad observadas a las dosis de 0.01 mg L^{-1} y 0.1 mg L^{-1} deben ser tomadas en cuenta.

4.2 *Azoxistrobina*

A medida que la concentración se fue aumentando, la longitud del tubo germinativo de las ascosporas que se desarrollaron bajo el efecto de las diferentes dosis del fungicida azoxistrobina (Bankit®), se redujo marcadamente dentro de cada finca (Tabla 4).

Tabla 4: Longitud promedio del tubo germinativo en micras, de ascosporas que se desarrollaron bajo el efecto de las diferentes dosis del fungicida azoxistrobina.

Zona / finca	Concentración de azoxistrobina (mg L^{-1})			
Tratada	**0.1**	**1.0**	**5.0**	**10.0**
Cedro	123.81	65.02	46.69	38.59
Corotú	89.51	65.57	49.63	30.88
Promedio + D.E.	106.66 ± 14.26	65.30 ± 11.09	48.16 ± 9.87	34.74 ± 12.37
No tratada				
San Bartolo	77.57	55.17	38.11	24.04

Las pruebas análisis de varianza aplicadas para determinar diferencias entre fincas por dosis, lograron reconocer diferencias estadísticamente significativas entre las comparaciones realizadas. Tal es el caso de la dosis 0.1 mg L^{-1}, donde la longitud promedio del tubo germinativo de las ascosporas fue significativamente diferente ($P< 0.0001$). Por el contrario, los resultados obtenidos de los ensayos realizados con una concentración de 1.0 mg L^{-1}, no reflejan diferencias significativas ($P< 0.0001$) entre las fincas de Cedro y Corotú, pero sí entre estas dos y la de San Bartolo. Las diferencias también pudieron ser detectadas ($P< 0.0001$) a una concentración de 5 mg L^{-1}, entre las tres poblaciones analizadas. De la misma forma, y a una concentración de 10 mg L^{-1}, las poblaciones fueron estadísticamente diferentes ($P< 0.0001$). En todos los casos se encontraron diferencias entre las poblaciones tratadas contra la no tratada.

Las comparaciones por concentración de dosis, realizadas entre las categorías de crecimiento de tubo germinativo, para cada una de las poblaciones, se lograron demostrar las diferencias en las respuestas obtenidas. La figura 11 ilustra las dosis 1.0 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1}; siendo éstas, las concentraciones bajo las cuales dicho comportamiento fue más evidente

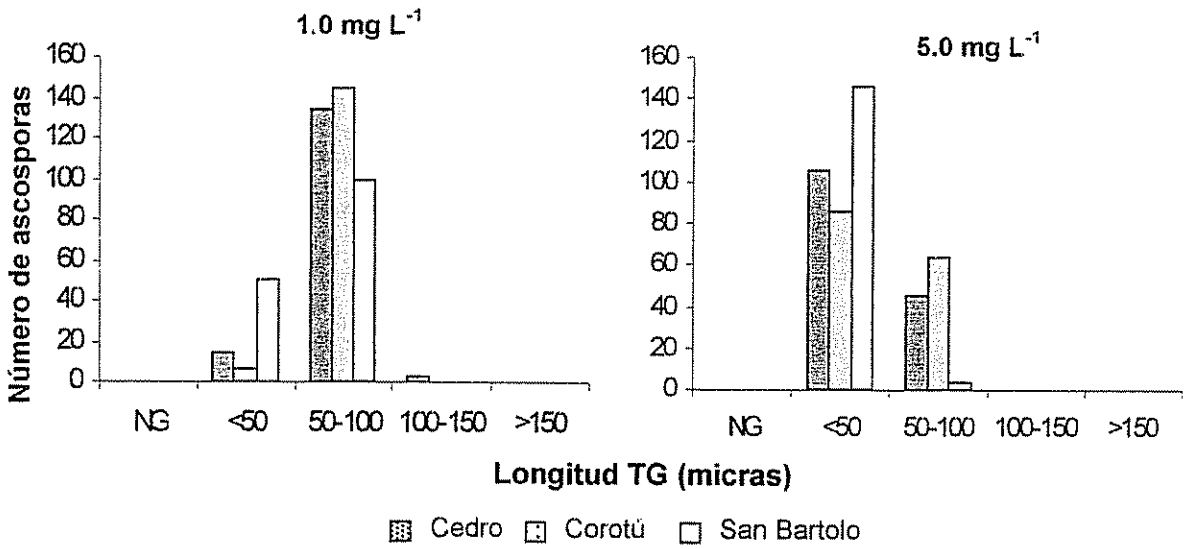


Figura 11: Número de ascosporas por categoría de crecimiento del tubo germinativo, cuando estuvieron bajo el efecto de las dosis 1.0 mg L^{-1} (izquierda) y 5.0 mg L^{-1} (derecha) del fungicida azoxistrobina. NG = ascosporas no germinadas.

Una cantidad considerable de ascosporas de las poblaciones tratadas, en ambas concentraciones, lograron desarrollar tubos germinativos mayores a las 50 micras;

principalmente las de Corotú (43%); mientras que, en la población no tratada, cuando se aumentó la concentración de la dosis, solo un número muy reducido de ellas alcanzó tales dimensiones (3%). Esto sugiere que la población silvestre (San Bartolo) presenta una mayor sensibilidad a la azoxistrobina.

Los porcentajes promedios de inhibición (tabla 5), también fueron aumentando simultáneamente con las concentraciones de las dosis, tanto para las poblaciones tratadas como para la no tratada, haciendo la aclaración que, en las fincas tratadas, este porcentaje siempre fue menor al de la no tratada.

Tabla 5: Porcentajes de inhibición del tubo germinativo de ascosporas por finca, cuando se aplicaron las diferentes dosis del fungicida azoxistrobina.

Zona / finca	Concentración de azoxistrobina (mg L^{-1})			
Tratada	**0.1**	**1.0**	**5.0**	**10.0**
Cedro	36.56	66.68	76.07	80.22
Corotú	51.67	63.42	72.31	83.32
Promedio + D.E.	44.12 ± 7.45	65.05 ± 5.89	74.19 ± 5.25	81.77 ± 6.47
No tratada				
San Bartolo	57.09	68.47	78.21	86.70

Al considerar las categorías de porcentaje de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo, igualmente la prueba de Chí cuadrado pudo detectar estas diferencias. La figura 12, muestra como a las dosis de 1.0 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1} y en cada una de las poblaciones, existieron niveles de inhibición superiores al 50%.

Al comparar las fincas tratadas con la no tratada, podemos decir que a la dosis de 1.0 mg L^{-1}, hubo una situación contraria a lo esperado, ya que un mayor número de ascosporas (40%) de la finca Cedro fue inhibido en más de un 70%; mientras que en la población silvestre, solo un 33% de las ascosporas presentaron el mismo efecto. No obstante, la de Cedro fue la única población en la cual se encontraron ascosporas (1.4%) con menos de un 50% de inhibición.

A la dosis de 5.0 mg L^{-1} ya es posible observar de manera más clara, las diferencias en cuanto al número de ascosporas por población que fueron inhibidas en las diferentes categorías presentadas. La población de San Bartolo alcanzó un número de ascosporas

con más de un 70% de inhibición, superior al de las fincas tratadas; reflejando una mayor sensibilidad que las demás.

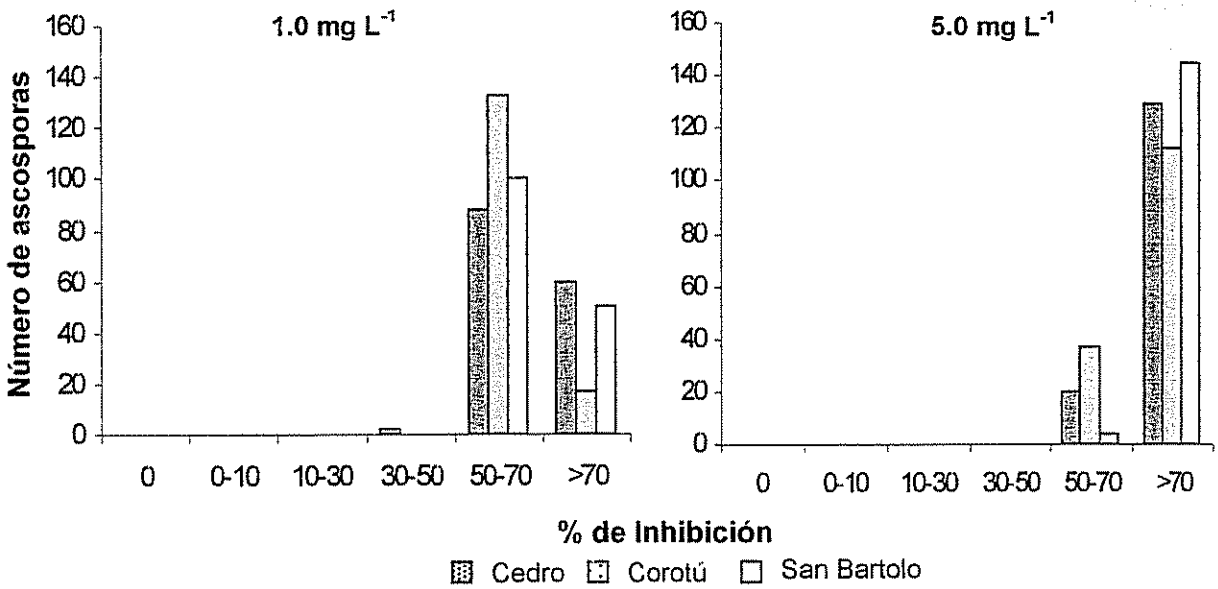


Figura 12: Número de ascosporas por porcentaje de categoría de inhibición del desarrollo del tubo germinativo, cuando estuvieron bajo el efecto de las dosis 1.0 mg L^{-1} (izquierda) y 5.0 mg L^{-1} (derecha) del fungicida azoxistrobina.

Estudios de Chin *et al.* (2001), realizados con poblaciones del mismo patógeno provenientes de plantaciones comerciales de banano cultivadas en Centroamérica y Colombia, comprobaron que *M. fijiensis* demostró ser altamente sensible a fungicidas del grupo de las estrobirulinas entre los años de 1997 a 1999, período en que este tipo de fungicidas estaban empezando a usarse para el control de la Sigatoka negra. Sin embargo, ya en poblaciones del hongo colectadas desde plantaciones de Colombia y sobre todo Costa Rica, se pudieron detectar individuos con algún nivel de pérdida de sensibilidad a este grupo fungicidas sistémicos.

El mismo autor pudo observar, como las ascosporas de poblaciones del patógeno provenientes de las zonas comerciales no germinaban a una dosis de 1.0 ppm en las pruebas realizadas en 1997, pero ya para el año de 1999, las ascosporas lograban desarrollar tubos germinativos a concentraciones de 3 ppm, indicando la existencia de posibles individuos resistentes.

Los valores de la CE_{50} para el fungicida azoxistrobina, no se calcularon debido a que las concentraciones de las dosis del producto utilizadas fueron muy elevadas como para poder obtener dicha información; por lo tanto, los valores de CE_{50} presentados en este documento, son solo valores estimados. Los resultados en cuanto a porcentaje de inhibición observados, sirvieron para calcular las CE_{75} de cada una de las fincas analizadas.

La gráfica de pendientes (figura 13) de las fincas tratadas y de la no tratada, permite observar la diferencia en las tendencias resultantes por parte de las poblaciones, como una respuesta clara al efecto del fungicida. Nótese como, solo con la pendiente de la finca de Cedro se logra calcular una CE_{50} en base a los valores observados mientras que la de Corotú, apenas permite hacerlo.

Las pruebas estadísticas de comparación de pendientes aplicadas en esta etapa del estudio, demostraron la existencia de diferencias significativas entre las fincas tratadas y la no tratada ($P< 0.0001$). Las mismas diferencias fueron encontradas cuando se comparó a la finca Cedro contra la de San Bartolo ($P< 0.0001$) o a esta última contra la de Corotú ($P< 0.0001$).

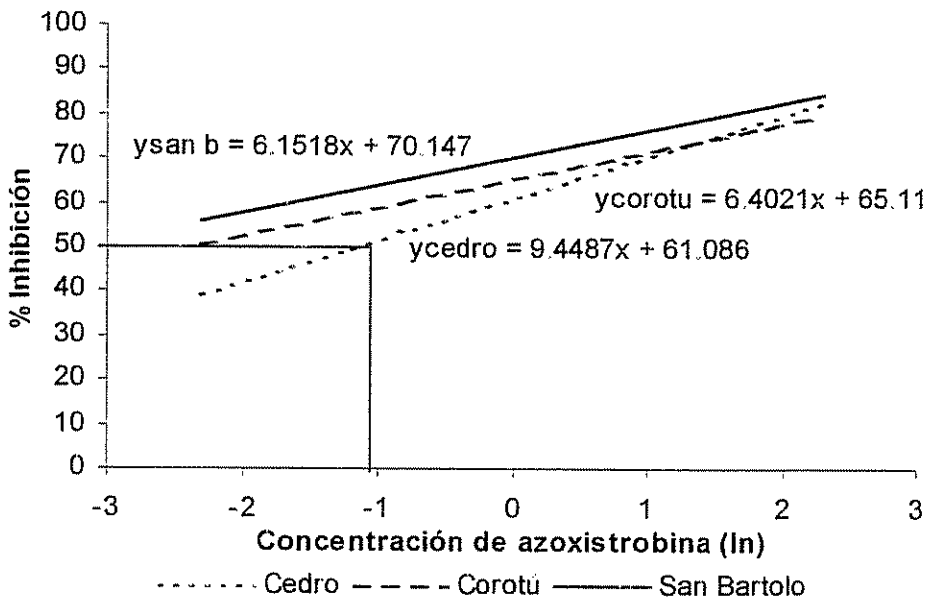


Figura 13: Comparación de pendientes lineales de regresión de las fincas de Cedro, Corotú y San Bartolo. Los valores de R^2 para cada una de las líneas de regresión son de 0.9607 para Cedro, 0.9514 para Corotú y de 0.9731 para San Bartolo.

Los valores de la CE_{50} y de la CE_{75} de las poblaciones tratadas analizadas se muestran en la tabla 6. En ella se puede apreciar con mayor claridad los niveles de dosis requeridos para lograr un 50% y 75% de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo de las ascosporas, para cada una de las poblaciones.

Tabla 6: Valores de la CE_{50} y la CE_{75} para las dos poblaciones de Cedro, Corotú y San Bartolo

Concentración efectiva (mg L^{-1})	Cedro	Corotú	San Bartolo
CE_{50}	0.309	0.094	0.037
CE_{75}	4.360	4.687	2.200

En el caso de las CE_{75} calculadas en base a los resultados obtenidos en la prueba de crecimiento de colonias, también se pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas. Tales significancias fueron iguales cuando se compararon a las fincas tratadas contra la no tratada, o cuando se comparó individualmente a una de las tratadas contra la silvestre ($P< 0.0001$). Las CE_{75} promedio, obtenidas para cada una de las poblaciones fueron de 0.7038 mg L^{-1}, 0.6584 mg L^{-1} y 0.3990 mg L^{-1}; para Cedro, Corotú y San Bartolo, respectivamente.

Al utilizar los valores de la CE_{75} para calcular el factor de resistencia (Cedro: 1.98, Corotú: 2.1) de las fincas tratadas contra la no tratada, se evidencia una pérdida gradual de sensibilidad de estas poblaciones a la azoxistrobina. Sin embargo, estos factores de resistencia son aún de baja magnitud. Ambas pruebas realizadas para medir el nivel de sensibilidad de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* al fungicida azoxistrobina; tanto la de ascosporas como la de colonias, advierten un nivel bajo de pérdida de sensibilidad al producto por parte del patógeno.

Los resultados de este estudio coinciden con los obtenidos por Chin y colaboradores (2001), quienes observaron la presencia de individuos con cierto grado de pérdida de sensibilidad a la azoxistrobina, evidenciada con la prueba de Factor de Resistencia, donde las poblaciones de la zona tratada tienen un factor que está por encima de 1.0 pero inferior a 3.0, lo que indica una disminución muy leve de la sensibilidad.

Por otra parte, pruebas de sensibilidad a las estrobirulinas realizadas en poblaciones de otro tipo de patógeno, han revelado de igual forma la pérdida de sensibilidad a este grupo de fungicidas. Olaya y Köller (1999) detectaron la resistencia *in vitro* de *Venturia inaequalis* a las azoxistrobinas, igual que Fraaije *et al* (2002) con *Blumeria graminis* en los cultivos de manzanas y trigo respectivamente.

Es probable que las poblaciones de las fincas tratadas; a pesar de sus altos niveles de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo, están perdiendo o reduciendo la sensibilidad al fungicida azoxistrobina. Los datos mostrados en la tabla 7, indican el número de veces en que cada una de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* que fueron colectadas en las fincas tratadas, han disminuido su sensibilidad en relación con la población testigo o finca no tratada. Se destaca el hecho que a la dosis de 0.1 mg L^{-1}, la población de Cedro resultó ser 35.96 veces menos sensible que la de San Bartolo (población testigo); mientras que, la de Corotú, a pesar de no haber alcanzado esos niveles de pérdida de sensibilidad, siempre se mantuvo en un rango entre tres y nueve veces menos sensible al producto estudiado, que la población silvestre.

Tabla 7: Valores del porcentaje de pérdida de sensibilidad en relación a la población San Bartolo, al fungicida azoxistrobina por dosis, en las dos poblaciones tratadas evaluadas.

Finca	Concentración de azoxistrobina (mg L^{-1})			
	0.1	1.0	5.0	10.0
Cedro	35.96	2.61	2.74	7.47
Corotú	9.49	7.37	7.55	3.89

Tal vez, los altos niveles de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo (> 50%) de las ascosporas provenientes de cada una de las poblaciones analizadas, se deba al hecho de que el fungicida azoxistrobina es un producto de uso poco frecuente entre los productores de plátano de Panamá; no obstante, y de acuerdo a lo observado por Chin, es correcto pensar que este fungicida aun pueda tener un efecto que se considere como satisfactorio en el control de la enfermedad y que gradualmente irá perdiendo su efectividad si no se llegaran a aplicar técnicas de antirresistencia.

Llama la atención el hecho de que no se pudo detectar una pérdida de sensibilidad clara en las poblaciones provenientes de la zona tratada al propiconazole pero sí a la

azoxistrobina, a pesar de que el primer fungicida ha sido utilizado por los productores de plátano desde mucho antes que las estrobirulinas.

La respuesta a esto, tal vez, esté relacionada al hecho de que las estrobirulinas, al igual que los propiconazoles, son consideradas como fungicidas de alto riesgo al desarrollo de resistencia por parte de los patógenos, pero debido al modo de acción específico de cada uno de los productos mencionados, las azoxistrobinas son más propensas a la resistencia que los propiconazoles.

Fraaije *et al* (2002) y Chin *et al* (2001) coinciden al decir que la resistencia observada en *Blumeria graminis* se debió al reemplazo de una glicina por una alanina en el gen b del citocromo. Se entiende con esto que para que un patógeno desarrolle resistencia a la azoxistrobina, hace falta un solo cambio en la estructura de un gen, mientras que para que se desarrolle resistencia a los propiconazoles, el hongo debe alterar la estructura de muchas de las enzimas que son afectadas por este fungicida.

Es muy probable que este cambio halla ocurrido en aquellos individuos de las zonas tratadas que lograron tener un mayor crecimiento de los tubos germinativos, ya que por el modo de acción, es posible que en poco tiempo estos organismos logren desarrollar resistencia a las estrobirulinas.

4.3 Benzimidazol

Los resultados observados en las tres poblaciones, cuando se les aplicaron las distintas dosis del fungicida benzimidazol (Benlate 50 PS), reflejan las diferencias encontradas entre las poblaciones, considerando las cuatro categorías de desarrollo en las que fueron clasificadas las ascosporas de cada población (tabla 8). Las mayores diferencias se presentaron bajo las concentraciones de 1.0 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1}.

En el gráfico (figura 14) se representan estos valores solo para las dosis de 1.0 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1}. En el se logra evidenciar con mayor claridad, como la población de Cedro fue la que demostró una menor sensibilidad al fungicida en ambas concentraciones, ya que

en ambos casos, las ascosporas de esta población lograron un desarrollo que se pudo clasificar como normal.

Tabla 8: Desarrollo de ascosporas por categoría, cuando estuvieron bajo el efecto de las diferentes dosis del fungicida benzimidazol.

Finca	Categoría	Dosis			
		0.1	1.0	5.0	10.0
Cedro	NG	0	41	16	19
	D	0	51	98	131
	TC	23	37	35	0
	GN	127	21	1	0
Corotú	NG	0	0	20	108
	D	0	0	78	30
	TC	150	150	52	12
	GN	0	0	0	0
San Bartolo	NG	0	58	87	101
	D	0	78	53	46
	TC	22	14	10	2
	GN	128	0	0	0

La prueba de Chí cuadrado que se empleó para demostrar diferencias significativas entre las fincas, reafirma lo señalado anteriormente, ya que en todos los casos, sí hubo significancia entre las respuestas de las poblaciones para cada una de las dosis ($P< 0.0001$); excepto para la dosis de 0.1 mg L^{-1}, donde no se pudieron detectar tales diferencias.

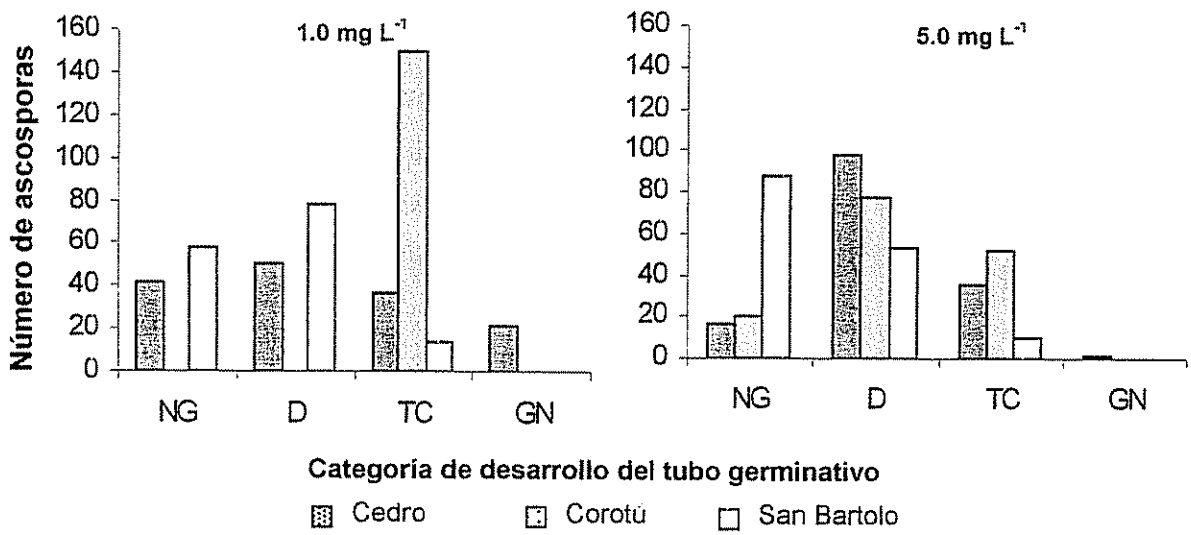


Figura 14: Número de ascosporas por categoría de desarrollo, cuando estuvieron bajo el efecto de las dosis 1.0 mg L^{-1} (izquierda) y 5.0 mg L^{-1} (derecha) del fungicida benzimidazol.

A la dosis de 5.0 mg L^{-1}, se puede observar que en la población silvestre solo un pequeño número de las 150 ascosporas fue capaz de desarrollar tubos germinativos cortos. La mayoría de las ascosporas de esta población tuvieron una germinación distorsionada o simplemente no germinaron. Sin embargo, en las fincas de Cedro y Corotú (tratadas), solo un número reducido de ellas no germinó, habiendo una cantidad considerable de ascosporas que sí lograron desarrollar tubos cortos.

El modo de acción de este fungicida impide el desarrollo del proceso de mitosis afectando directamente la formación del tubo germinativo. Sin embargo, algunas ascosporas de las poblaciones provenientes de la zona tratada lograron desarrollar tubos cortos bajo las dosis altas de benzimidazol. Esto refleja un nivel, aunque bajo, de la pérdida de sensibilidad del patógeno hacia el producto, pues se espera que los individuos que estén bajo el efecto de este químico no germinen o desarrollen tubos germinativos distorsionados.

La existencia de ascosporas capaces de desarrollar tubos germinativos, aún en las concentraciones elevadas del fungicida, permite que éstas sean consideradas como individuos resistentes o con altos niveles de pérdida de sensibilidad al benzimidazol.

En las pruebas realizadas con la formación de colonias, también se obtuvieron diferencias significativas al hacer las comparaciones entre las CE_{75} de las poblaciones tratadas contra la no tratada. Al hacer comparaciones entre Cedro y San Bartolo ($P< 0.0001$), los resultados estadísticos demostraron una significancia importante, al igual que en las comparaciones hechas entre Corotú y nuestra finca testigo ($P< 0.0001$). Las CE_{75} promedio, obtenidas para cada una de las poblaciones fueron de 0.9109 mg L^{-1}, 0.9176 mg L^{-1} y 0.5020 mg L^{-1}; para Cedro, Corotú y San Bartolo, respectivamente.

Igual que en el caso del fungicida anterior, aquí se demuestra una pérdida de sensibilidad al benzimidazol por parte de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* que han estado bajo tratamiento químico formulado con base en este producto.

Romero y Sutton (1998), encontraron en plantaciones de banano del Caribe costarricense, poblaciones del hongo altamente resistentes a los benzimidazoles, aun en fincas donde el producto había dejado de usarse durante mas de dos años. Por el sistema

de producción existente en la producción comercial de banano en Costa Rica, el patógeno está bajo una presión de selección mucho más intensa que en las plantaciones de plátano del Pacífico panameño; sin embargo, es evidente que las poblaciones de *M. fijiensis* provenientes de zonas tratadas analizadas en este estudio, han logrado desarrollar un nivel de tolerancia al fungicida, lo cual coincide con las pruebas realizadas por los autores arriba mencionados.

Es posible que la pérdida de sensibilidad de las poblaciones de *M. fijiensis* a los diferentes fungicidas sistémicos utilizado se deba al uso indebido de éstos productos por la falta de conocimiento de quienes los aplican. Es muy probable que los agricultores apliquen fungicidas de diferente nombre comercial, con la intención de aplicar un sistema de rotación, sin saber que esos fungicidas pertenecen al mismo grupo químico.

De igual forma Yourman *et al* (2000), pero analizando la sensibilidad de *Botrytis cinerea*, realizaron pruebas de sensibilidad con 35 aislamientos de este patógeno, de los cuales 17 resultaron ser resistentes, lo cual comprueba la capacidad que tienen estos organismos de desarrollar resistencia a este grupo de sustancias químicas empleadas para el control de las enfermedades.

Por otro lado, los bajos niveles de pérdida de sensibilidad encontrados en este estudio, puede que sean un reflejo de las condiciones de la zona de muestreo, ya que esta se caracteriza por la abundancia de fincas donde no se aplican ningún tipo de programas de control químico para el manejo de la enfermedad. Debido a esto, la recombinación de material genético silvestre con el de poblaciones tolerantes puede estar siempre presente dentro de las plantaciones , impidiendo que las poblaciones del patógeno desarrollen niveles de resistencia altos a los fungicidas sistémicos empleados.

BIBLIOTECA
Centro Internacional de Ciencias
e Información Agrícola

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 *Conclusiones*

1. La finca silvestre (San Bartolo) permitió establecer una población de línea base, a partir de la cual, se realizaron las comparaciones contra las poblaciones provenientes de las zonas tratadas, pudiéndose determinar los niveles de sensibilidad a los fungicidas sistémicos probados; excepto solo para el propiconazole.

2. Al analizar las respuestas de las tres poblaciones al fungicida propiconazole (Tilt), no se logró demostrar que las fincas de la zona tratada fueran menos sensibles a este producto que la silvestre. Existe la probabilidad de que la finca de San Bartolo esté influenciada genéticamente por ascosporas provenientes de poblaciones que hayan estado permanentemente bajo el efecto de fungicidas pertenecientes a este grupo químico.

3. Para los casos de los fungicidas azoxistrobina y benzimidazol, las poblaciones pertenecientes a las fincas tratadas demostraron ser diferentes a la finca no tratada en cuanto a la sensibilidad de las ascosporas y colonias, siendo las primeras menos sensibles.

4. Los niveles de porcentaje de pérdida de sensibilidad de cada finca analizada, indican que los fungicidas evaluados aun logran mantener niveles de eficacia aceptables para el control de la Sigatoka negra, debido a que en las tres poblaciones siempre existieron niveles de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo, superiores al 50%.

5. Aunque, en las pruebas *in vitro* realizadas se demostró un alto porcentaje de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo de las ascosporas por efecto del propiconazole, cabe resaltar el hecho de que existen ascosporas provenientes de las fincas tratadas que lograron desarrollar, aun en las concentraciones más elevadas del producto, tubos germinativos con niveles de inhibición inferiores al 10%. Esto crea la posibilidad de que ya hay presentes en campo, individuos dentro de las poblaciones del hongo que están empezando a desarrollar mecanismos de resistencia hacia los triazoles más comúnmente utilizados por los productores de plátano en Panamá.

5.2 *Recomendaciones*

1. Los altos porcentajes de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo encontrados en las ascosporas de las poblaciones analizadas, permiten recomendar seguir con las aplicaciones de estos fungicidas pero haciendo un uso racional de los mismos.

2. Atendiendo la presencia de ascosporas que lograron tener una germinación normal o que fueron inhibidas en menos de un 10% a las concentraciones elevadas de las dosis de propiconazole, se recomienda la adopción de técnicas de antiresistencia que consistan en la alternancia de este producto con grupos de fungicidas de un modo de acción diferente, para evitar de esta manera, el desarrollo precoz de poblaciones del hongo resistentes a este fungicida sistémico.

3. Es importante que metodologías como esta, se incorporen a los programas de manejo integrado de la Sigatoka negra, como un complemento de las pruebas de preaviso biológico o meteorológico, con las cuales se podría determinar el momento preciso en que el fungicida desempeña una mayor eficacia en el combate de la enfermedad.

4. Debido a la evidencia presentada en este estudio y a la experiencia vivida en otros países con el desarrollo de resistencia de *M. fijiensis* a los fungicidas, será necesario en el futuro, establecer programas de monitoreo de sensibilidad de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas sistémicos, comúnmente utilizados por los productores de plátano en Panamá.

5. Se deben realizar estudios que permitan establecer la curva de progreso de la enfermedad, para determinar los períodos de mayor riesgo de infección y de desarrollo de la resistencia.

7. BIBLIOGRAFÍA

Arango, M.E. 2000. Manejo de sustratos para el control biológico de Sigatoka negra (*Mycosphaerrella fijiensis* Morelet) en el cultivo del banano (Musa AAA). Tesis Mag. MSc. Turrialba, CR, CATIE. 102 p.

Arciniegas, A.; Riveros, A. S.; Loaíza, J. 2002. Evidencia de actividad antifúngica *in vitro*, sobre *Mycosphaerella fijiensis* causada por extractos vegetales. En: Resúmenes congreso Acorbat. Cartagena, Colombia.

Bayles, R.; Burnett, F.; Naiper, B. 2001. Designing fungicide programmes to minimise the risk of resistance in wheat and barley mildew and wheat yellow rust. Home Grown Cereals Authority; London; UK. Proyec Report. No. 243. 60 p.

Belálcazar, S. 2002. Altas densidades de siembre en plátano, una alternativa rentable y sostenible de producción. En: Resúmenes congreso Acorbat. Cartagena, Colombia.

Brent, K. 1995. Fungicide resistance in crops pathogens: how can it be managed?. St Raphael, Norton Lane, United Kingdom. 48 p.

Calvo, C; Romero, R. 1996. Distribución y dinámica de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis*, a los fungicidas propiconazole y tridemorph en banano. *In*: X congreso nacional agronómico y de recursos naturales: fitopatología ¿puede la agricultura sostenible ser competitiva? Bertsch, Rivera, Mora, Navarro, Badilla. (eds). San José, Costa Rica.

Chin, K.M.; Wirz, M.; Laird, D.. 2001. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. Plant Disease. 85 (12): 1264- 1270.

Cordeiro, Z.J., Pires de Matos, A., De Oliveira e Silva, S. 1998. La sigatoka negra en Brasil. *In* Informusa. The international magazine on banana and plantain. Vol 7(1):30-31

Cordero, M; González,S. 1988. El control químico de la sigatoka negra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas, Venezuela.15 p

Corrales, O; Marín, D. 1992. Modificación del. sistema de preaviso biológico para el combate de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) para banano y plátano en Costa Rica. *In* Sandoval, JA; Vargas, R. eds. La divulgación científica al servicio del productor bananero nacional. San José, CR. CORBANA. P. 100-103.

Cortés Enríquez, G. 1994. Atlas agropecuario de costa rica. San José, C.R., EUNED. 532 p.

Dekker, J. 1995 Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. Modern selective fungicides. Ed. By H Lyr. p. 23-38.

_____. 1982. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: Center for Agricultural Publishing and documentation, 1982. p.1-15.

Deighton, F.C. 1976. Studies on *Cercospora*and and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg. *Pantospora* Cif. and *Cercosetporia petri*. Mycological Papers 140, 1-168

_____, 1979. Studies on *Cercospora*and and allied genera. VII. New species and redisposition. Mycological Papers 144, 1-56

FAO. 2002. Production yearbook. Statistics. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome, Italy. http // www.fao.org

Fraaije, B. A.; Butters, J. A.; Coelho, J. M.; Jones, D. R.; Hollomon, D. W. 2002. Followings the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. Sp. Tritici using quantitative allele specific real-time PCR measurements with the fluorescents dye SYBR Green I. Plant Pathology. 51 (1): 45-54.

Frossard. 1980. Apparition d'une nouvelle et grave maladie foliaire des bananiers et plantains au Gabon: la maladie des raies noires: *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Fruits 35: 519-527.

Fouré, E. 1985. Black leaf streak disease of banana and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the disease in Gabon IRFA Paris.

_____; Moreau, A. 1992. Contribition á l'étude épidémiologique de la cercosporiose noire dans la zone de moungo au Cameroon de 1987 á 1989. Fruits 47, 3-6

Gangawane, L. V.. 1997. Management of fungicide resistance in plant pathogens. Indian Phytopathology. 50 (3). 305-315.

Gauhl, F. 1992. Epidemiología y ecología de la Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis, Morelet) en plátano (Musa sp.) en Costa Rica. Unión de Países Exportadores de Banano, Panamá. 114 p.

Georgopoulus, S.G. 1995. The genetics of fungicide resistance. Modern selective fungicides. Properties Applications, mechanisms of action. Ed. By H Lyr. p. 23-38.

González, M. 1987. Enfermedades del cultivo del banano Univesridad de costa Rica, C.R. 98 p.

González, R.1995. Effect de microoroganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Tesis MSc, CATIE, Turrialba, C.R. 94 p.

González, M. 1987. Enfermedades del cultivo del banano. Univesridad de costa Rica, C.R. 98 p.

Gutiérrez Chan, F.A. 1996 Estudio de factores en la inducción de resistencia a Mycosphaerella fijiensis y promoción de crecimiento en plantas de banano. Tesis Mag Sc, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 91 p.

Guzmán, M; Romero, R. 1997. Comparación de los fungicidas azoxistrobina, propiconazole y difenoconazole en el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa* AAA). Corbana 22 (47): 49-59.

Guzmán, M; Romero, R. 1996. Eficacia de cuatro dosis de aceite agrícola en el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa* AAA). *In* Sandoval, JA; Vargas, R. eds. La divulgación.

Hernández, G. 1991. Los plátanos. Barcelona, España. p 180.

IDIAP (Instituto de investigación agropecuaria de panamá). 1996. Programa de incremento de la producción agropecuaria. David, Panamá. 25 p.

Ishii, H.; Fraaije, B. A.; Sugiyama, T.; Noguchi, K.; Nishimura, K.; Takeda, T.; Amano, T.; Hollomon, D. W. 2001. Ocurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. Phytopathology. 91(12): 1166-1171.

Jones, D. 2000. Desease of banana, Abacá and Enset. CAB International, Wallintong, UK. p 544.

Karaoglanidis, G. S.; Ioannidis, R. M.; Thanassoulopoulos, C. C.. 2002. Changes in the sensitivity of *Cercospora beticola* populations to sterol-demethylation-inhibiting fungicides during a 4-year period in northern Greece. Plant Pathology 51 (1). 55-62.

Klem, K. 2000. Fungicide resistance of *Blumeria graminis* f. sp. tritici and f. sp. hordei populations in the territory of the Czech Republic. Rostlinna-Vyroba. 46(7): 311-317.

Lescot, T; Céspedes, C; Medina, H. 2000. Prevención y manejo de la sigatoka negra en cultivos de guineo y plátano en la república dominicana. Santo Domingo, República Dominicana. 19 p.

Marcelino, L; González, V. 2001. Estrategias para el aprovechamiento de la fruta rechazada como producto de la comercialización del plátano. Actualidad Agropecuaria 9. 13-15.

Marcelino, L.; Quintero, A. 1994. Caracterización de la producción de plátano en la provincia de Chiriquí. David, Panamá. 18 p.

_____. 1992. El cultivo de plátano (*Musa* AAB) en Panamá. *In*: El plátano (Musa *AAB*,ABB) en américa latina. Unión de países exportadores de banano. Panamá. p. 390.

Marín, D y Romero, R. 1992. El combate de la sigatoka negra. *In*: Boletín No. 4 Departamento de Investigaciones. CORBANA. San José. Costa Rica.

Martínez, G., Pargas, R., Manzanilla, E., Muñoz, D. 1998. Sigatoka negra en Venezuela, informe 1997. *In* Infomusa. The international magazine on banana and plantain. Vol 7(1):31-32.

Meredith, D.S.; Lawrence, J.S. 1970. Black leaf streack disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Suceptibility of cultivars. Tropical Agriculture 47, 275-287.

_____. 1969. Black leaf streack disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. Transactions of the British Mycological Society 52, 459-476.

Merchán V, VM. 1998. Manejo de problemas fitosanitarios del cultivo del plátano en la zona central cafetera. *In* Giraldo C,MJ; Belalcázar C, SL; Cayón S, DG; Botero I, RG. eds. Seminario internacional de producción de plátano, Armenia, CO. p.177-191.

_____. 1990. Update of research on *Mycosphaerella spp*. In Colombia. In: Fullerton, R.A. and Stover, R.H. (eds) Sigatoka Leaf Spot Diseases of Bananas, Proceedings of an International Workshop held at San José, Costa Rica, 28 March-1 April 1989. International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP), Montpellier, France, pp. 50-55.

MIDA (Ministerio de desarrollo agropecuario). 1999. Caracterización del cultivo de plátano en la provincia de chiriquí. Panamá. 18 p.

Miranda, J.E. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), colocados en el interior y exterior de la planta de banano. Tesis MSc., CATIE. Turrialba, C.R.

Mulder, J.L. and Holliday, P. 1974b *Mycosphaerella fijiensis*. Descriptions and Pathogenic Fungi and Bacteria No. 413. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK.

Mulder, J.L.; Stover, R.H. 1976.*Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. Transactions of the British Mycological Society 67, 77-82.

Müller, R.; Pasberg-Gauhl, C.; Gauhl, F.; Ramser, J.; Kahl, G. 1997. Oligonucleotide fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigerian *Mycosphaerella fijiensis*. Journal of Phytopathology 145, 25-30

Olaya, G.; Köller, W. 1998. Baseline sensitivietes of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl.Plant Disease. 83 (3): 274-278.

Orozco-Santos, M., Orozco-Romero, J., Farías-Larios, J., Vásquez, V. 2001. La sigatoka negra (*Mycosphaerella fijienssi* Morelet) en México. In Infomusa. The international magazine on banana and plantain. Vol 10(1):33-37.

_____. 2001. Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre sigatoka negra en banano. Tesis MSc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Pérez, V.L. 1998. Black sigatoka disease control in banana and plantain in plantations in Cuba. In Infomusa. The international magazine on banana and plantain. Vol 7(1):27-30.

Pons, N. 1990. Taxonomy of Cercospora and related genera. In: Fullerton, R.A. and Stover, R.H. (eds) Sigatoka leaf spot diseases of bananas, Proceding of international workshop held in San José, Costa Rica, March 28-April 1, 1989. INIBAP, Montpellier, France, pp. 360-370.

Raemaekers. 1975. Blakc leaf streaklike disease in Zambia. P.A.N.S., 21:396-400.

Ramírez, G; Rodríguez, J. 1988. Tecnología para la producción de plátano en tabasco. INIFAB, Villa Hermosa, Tabasco. 8-34

Rhodes, PL. 1964. A new banana diseasein Fidji. Commonw. Phytopathol. News 10:38-41.

Robbertse, B.; Rijst, M. van der; Aarde, I. M. R. van; Lennox, C.; Crows, P. W.. 2001. DMI sensitivity and cross resistance patterns of *Rhynchosporium secalis* isolates from South Africa. Crop Protection. 20 (2): 97-102.

Rosales, F.; Pocasangre, L. 2002. Mejoramiento convencional de banano y plátano: estrategias y logros. Acorbat,. Cartagena, Colombia.

Romero, R. A.; Sutton, T. B.. 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. Plant Disease. 82: 931-934.

_____. 1997. Sensitivy of Mycosphaerella fijiensis, causal agent of sigatoka negra of bananas, to propiconazole. Phytopathology 87(1): 96-100.

Rowe, P. 1998. Mejoramiento de banano y plátano resistentes a plagas y enfemedades: Rosales, F.E.; Triptom, S.C. y Cerna eds. 1999. Producción de banano orgánico y, o, ambientalmente amigable. Memorias de taller internacional

realizado en la EARTH, Guácimo, C.R.- 27-29 de julio de 1998. Red internacional para el mejoramiento del banano y el platano, Montpellier, Francia.

Rowe y Rosales. 1994. Musa breding at FHIA. *In* The improvement and testing of musa: a global parnertship. DR Jones ed. INIBAB, Parc Scientifique Agropolis, Montpellier, France. p 117- 129.

Sierotzky, H.; Parisi, S.; Steinfeld, U.; Tenzer, I.; Poirey, S.; Gisi, U. 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the ciytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. Pest Management Science. 50 (10): 833-841.

Sisler, H. 1995. Sterol Biosynthesis Inhibitors. S.l. s.n.

Steinkellner, S.; Redl, H. 2001. Sensitivity of *Uncinula necator* populations following DMI – fungicide usage in austrian vineyards. Bodenkultur. 52(4): 293 – 299

Stover, R.H. 1987. Producción de plátano en presencia de sigatoka negra. *In*: Pinopchet, J. Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la zona centroamericana. Informe Técnico No. 10. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza, CATIE. Panamá. 27-36 p.

Stover, R.H. 1980. Diseminación del agente causal, epidemiología y control de la sigatoka negra. *In* Sigatoka negra. Memoria de la reunión técnica internacional, San José, C.R. UPEB. P14-15

Stover, R.H. 1972. Banana, plantain and abaca diseases. Commontwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 316 p.

Stover, R.H.; Dickson,J.D. 1976. Banana leaf spot caused by Mycosphaerella musicola: methods of measuring spotting prevalence and severity. Tropical Agriculture (Trinidad) 47, 289-302

Stover, R & Simmonds, N. 1987. Bananas. Longman scientific & technical.Third edition 463.

Talavera Sevilla, M.E. 1996. Determinación de glucano en subproductos agrícolas y evaluación del efecto de microorganismos glucanolíticos sobre Mycosphaerella fijiensis en banano. Tesis MSc. Catie. Turrialba, Costa Rica. 80 p

Tejerina, JC; Meriles, G; Stover, RH; Ploetz, RC. Ramanoff. 1997. First report First report black sigatoka negra in Bolivia. Plan disease 81(11): 1332.

Yourman, L.F., Jeffers, S.N., and Dean, R.A. 2000. Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. Phytopathology 90:851-859.

8. ANEXOS

ANEXO 3. Preparación de Medios para el Fungicida Azoxistrobina (Bankit® 25 SC) 250 g.i.a L^{-1}

Para preparar	Con (mg L^{-1})	Agregar de	Balón 100 ml
SM 1	100	Bankit® 25 SC	0.04 ml
SM 2	10	SM 1	10 ml
SM 3	1.0	SM 2	10 ml
SM 4	0.1	SM 3	10 ml
SM 5	0.01	SM 4	10 ml

Preparación de las soluciones PDA o Agar + Funguicida

Para preparar	Agregar de	Balón		
Con (mg L^{-1})		100 ml	200 ml	250 ml
0.001	SM 5	1 ml	2 ml	2.5 ml
0.01	SM 4	1 ml	2 ml	2.5 ml
0.1	SM 3	1 ml	2 ml	2.5 ml
1.0	SM 2	1 ml	2 ml	2.5 ml
5.0	SM 1	0.5 ml	1ml	1.25 ml
10.0	SM 1	1 ml	2 ml	2.5 ml

ANEXO 2. Preparacion de Medios para el Fungicida Benomil (Benlate® 50 PS)

Para preparar	Con (mg L^{-1})	Agregar de	Balón 100 ml
SM 1	1000	Benlate® 50 PS	0.2 g
SM 2	100	SM 1	10 ml
SM 3	10	SM 2	10 ml
SM 4	1.0	SM 3	10 ml
SM 5	0.1	SM 4	10 ml

Preparación de las soluciones PDA o Agar + Funguicida

Para preparar	Agregar de	Balón		
Con (mg L^{-1})		100 ml	200 ml	250 ml
0.001	SM 5	1 ml	2 ml	2.5 ml
0.01	SM 4	1 ml	2 ml	2.5 ml
0.1	SM 3	1 ml	2 ml	2.5 ml
1.0	SM 2	1 ml	2 ml	2.5 ml
5.0	SM 1	0.5 ml	1ml	1.25 ml
10.0	SM 1	1 ml	2 ml	2.5 ml

ANEXO 1. Preparacion de Medios para el Fungicida Propiconazole (Tilt® 25EC) 250 g.i.a. L^{-1}

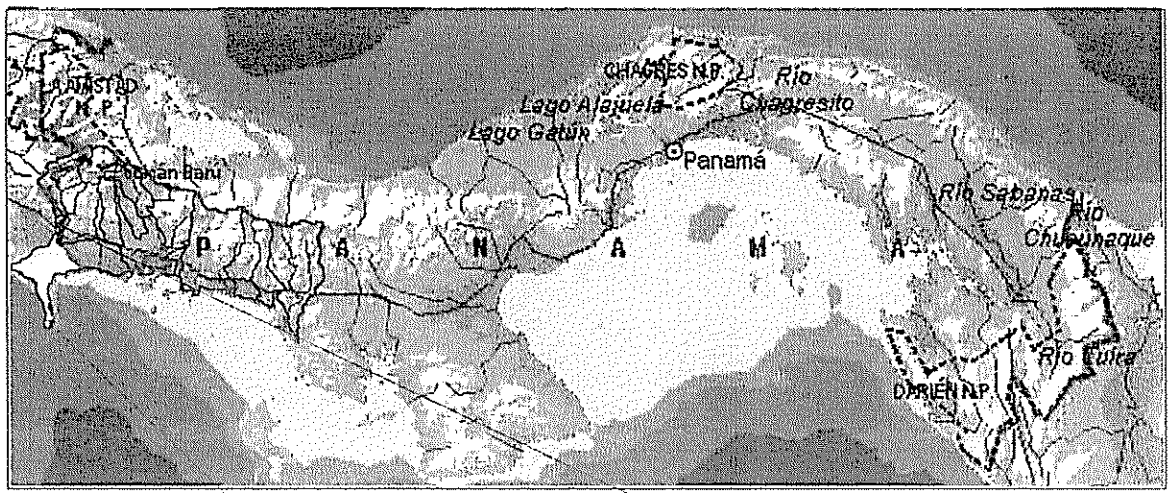
Preparación de las soluciones patron (en agua).

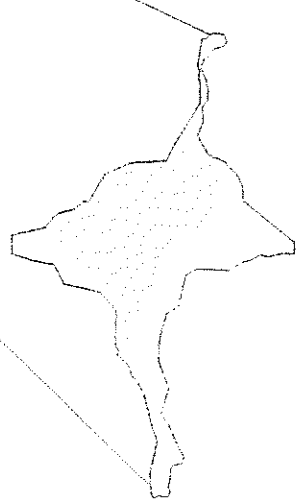
Para preparar	Con (mg L^{-1})	Agregar de	Balón 100 ml
SM 1	100	tilt® 25 EC	0.04 ml
SM 2	10	SM 1	10 ml
SM 3	1.0	SM 2	10 ml
SM 4	0.1	SM 3	10 ml
SM 5	0.01	SM 4	10 ml

Prearacion de las soluciones PDA o Agar + Funguicida

Para preparar	Agregar de	Balón		
Con (mg L^{-1})		100 ml	200 ml	250 ml
0.0001	SM 5	1 ml	2 ml	2.5ml
.0001	SM 4	1 ml	2 ml	2.5ml
0.01	SM 3	1 ml	2 ml	2.5ml
0.1	SM 2	1 ml	2 ml	2.5ml
1.0	SM 1	1 ml	2 ml	2.5ml

Ubicación del Distrito de Barú en la República de Panamá





Distrito de Barú
División de Distritos
Provincia de Chiriqu