

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
CAMPUS TECNOLÓGICO LOCAL SAN CARLOS**

**CUANTIFICACIÓN TEMPRANA DE *Pseudocercospora fijiensis* POR  
MEDIO DE qPCR EN MODELOS PREDICTIVOS DE SIGATOKA  
NEGRA EN PLANTAS DE BANANO (*Musa AAA*)**

**LUIS FERNANDO BENAVIDES LÓPEZ**

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Agronomía  
como requisito parcial para optar al grado de  
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía



Carrera de Ingeniería en Agronomía  
Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Sede Regional San Carlos  
2005 - 2018

**2019**

**CUANTIFICACIÓN TEMPRANA DE *Pseudocercospora fijiensis* POR  
MEDIO DE qPCR EN MODELOS PREDICTIVOS DE SIGATOKA  
NEGRA EN PLANTAS DE BANANO (*Musa AAA*)**

**LUIS FERNANDO BENAVIDES LÓPEZ**

**Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:**

Ing. Agr. Miguel Eduardo Muñoz Fonseca, PhD. \_\_\_\_\_  
Asesor principal

Ing. Fo. Ana Marlen Camacho Calvo, MSc. \_\_\_\_\_  
Asesora interna

Biol. Omar Gätjens Boniche, MSc. \_\_\_\_\_  
Jurado

Ing. Agr. Joaquín Durán Mora, PhD. \_\_\_\_\_  
Jurado

Ing. Agr. Zulay Castro Jiménez, MGA. \_\_\_\_\_  
Coordinadora  
Trabajos Finales de Graduación

---

Ing. Agr. Luis Alberto Camero Rey, MSc. \_\_\_\_\_  
Director  
Escuela de Agronomía

**2019**

**CUANTIFICACIÓN TEMPRANA DE *Pseudocercospora fijiensis* POR  
MEDIO DE qPCR EN MODELOS PREDICTIVOS DE SIGATOKA  
NEGRA EN PLANTAS DE BANANO (*Musa AAA*)**


**LUIS FERNANDO BENAVIDES LÓPEZ**

**Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:**

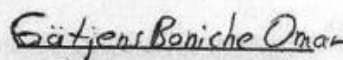
Ing. Agr. Miguel Eduardo Muñoz Fonseca, PhD.

  
Asesor principal

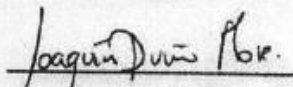
Ing. Fo. Ana Marien Camacho Calvo, MSc.

  
Asesora interna

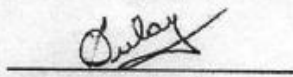
Biol. Omar Gätjens Boniche, MSc.

  
Jurado

Ing. Agr. Joaquín Durán Mora, PhD.

  
Jurado

Ing. Agr. Zulay Castro Jiménez, MGA.

  
Coordinadora

Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Luis Alberto Camero Rey, MSc.

  
Director  
Escuela de Agronomía

**2019**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Luis Alberto Benavides Arguedas y Marjorie López Mosquera por su amor incondicional, motivación y arduo esfuerzo al invertir en mi educación.

A los demás miembros de mi familia: Emelyn María Benavides López, Ana Miriam Benavides López, Katherine María Benavides López, Cinthya Delgado Ramírez, Dereck Rosales Delgado, Franklin Delgado Abarca, Flory Ramírez González, Ericka Delgado Ramírez, Kenia Zamora Guerrero, Jhoel Arroyo López, Thiago Calet Arroyo Benavides y Eliza Marcela Sandi Ulate. A todos les agradezco por creer siempre en mí, por su apoyo y amor incondicional brindado día a día, para alcanzar estas metas, y a todas aquellas personas que me motivaron a salir adelante en la vida...

A ellos, por hacer una diferencia significativa en mi vida dedico este triunfo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por guiar los pasos en mi vida.

A Cinthya Delgado Ramírez y Dereck Rosales Delgado por ser mis motivaciones para salir adelante, por su apoyo y amor incondicional.

A profesionales que me motivaron a estudiar Agronomía como el PhD. Ronald Francisco González Chinchilla, PhD. Miguel Eduardo Muñoz Fonseca y a la Ing. Agr. Alejandra Muñoz.

A todo el personal del Departamento de Investigaciones de DOLE Río Frío (Research), especialmente en el Laboratorio de Sigatoka Negra a los Srs. Ronald Monge, Michael Rojas, Rogdy Sandi por su significativa colaboración, disposición y consejos en la etapa experimental.

A todo el personal del Laboratorio de Biología Molecular de CORBANA, por brindar sus servicios profesionales y su colaboración con el procesamiento de muestras para alcanzar los objetivos del proyecto, especialmente a la MSc. Ana María Conejo y al MSc. Mauricio Guzmán Quesada.

Al PhD. Miguel Eduardo Muñoz Fonseca por ser guía, maestro y confiar en mis capacidades en este proceso profesional, debido a su liderazgo y capacidad para motivar al estudiante en los retos de la empresa que se transforman en proyectos, además su visión investigadora en este proceso del estudio fue significativa.

A la MSc. Ana Marlen Camacho Calvo, colaborando en el estudio estadístico de este estudio, por ser una excelente profesora durante mi formación académica, la cual motivo mi interés por la estadística.

Al profesor MSc. Omar Gätjens Boniche por ser parte de mi formación profesional al darme la oportunidad de ser estudiante asistente en el Laboratorio de Biología Molecular durante cuatro años y por su colaboración en las observaciones hechas al estudio.

Al profesor PhD. Joaquín Duran Mora por sus observaciones hechas al estudio.

A la coordinadora de los trabajos finales de graduación la MGA. Zulay Castro Jiménez por su apoyo en el periodo de tesis.

Al Ing. Mauricio Mora Murillo por su valiosa amistad y consejos que fueron valiosos en los aspectos personales, académicos y profesionales.

A todos los estudiantes que compartieron sonrisas, consejos, horas de estudio y momentos inolvidables en mi paso por el TEC, ya que fue una experiencia incomparable, de igual manera al personal administrativo y docente de la Escuela de Agronomía, así como al TEC en general muchas gracias por la educación de calidad que brindan a los estudiantes de Costa Rica.

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
TABLA DE CONTENIDO.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ANEXOS.....	xviii
<b>CAPÍTULO I. El cultivo de banano (<i>Musa AAA</i>), dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra (<i>Pseudocercospora fijiensis</i>) y uso de herramientas para su detección, predicción y combate.....</b>	<b>1</b>
1.1. RESUMEN.....	1
1.2. ABSTRACT.....	2
1.3. INTRODUCCIÓN.....	3
1.4. REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
1.4.1. Antecedentes del cultivo de banano .....	6
1.4.2. Importancia de la producción de banano en Costa Rica.....	6
1.4.3. Generalidades de la enfermedad Sigatoka Negra .....	7
1.4.3.1. Distribución geográfica, ecología y condiciones ambientales de la enfermedad Sigatoka Negra.....	7
1.4.3.2. Biología de la enfermedad Sigatoka Negra.....	9
1.4.3.3. Manejo de la enfermedad Sigatoka Negra .....	14
1.4.4. Herramientas desarrolladas para el monitoreo visual y el combate de la enfermedad Sigatoka Negra en las plantaciones de banano .....	15
1.4.5. Herramientas desarrolladas para la detección y cuantificación molecular del patógeno <i>Pseudocercospora fijiensis</i> , agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra.....	19
1.4.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	19

1.4.5.2. Detección y cuantificación molecular de Sigatoka Negra por medio de PCR.....	22
1.4.6. Modelos predictivos desarrollados para explicar la dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano .....	25
1.5. CONCLUSIONES .....	28
1.6. BIBLIOGRAFÍA.....	29
<b>CAPÍTULO II. Detección, cuantificación y monitoreo molecular temprano de Sigatoka Negra (<i>Pseudocercospora fijiensis</i>) en plantas de banano (<i>Musa AAA</i>) .....</b>	<b>42</b>
2.1. RESUMEN.....	42
2.2. ABSTRACT.....	43
2.3. INTRODUCCIÓN.....	44
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.4.1. Localización y periodo de estudio .....	46
2.4.2. Establecimiento y manejo del experimento .....	46
2.4.3. Descripción de la investigación .....	48
2.4.4. Etapa 1. Calibración del monitoreo molecular .....	48
2.4.4.1. Evaluación visual de la enfermedad.....	48
2.4.4.2. Identificación cualitativa y cuantitativa molecular de <i>P. fijiensis</i> por medio de PCR .....	49
2.4.5. Etapa 2. Monitoreo molecular temprano .....	52
2.4.5.1 Cuantificación molecular de <i>P. fijiensis</i> por medio de qPCR.....	52
2.4.5.2 Evaluación visual de la enfermedad.....	52
2.4.6. Variables de estudio.....	54
2.4.7. Diseño experimental .....	55
2.4.8. Análisis de datos .....	55
2.5. RESULTADOS .....	56
2.5.1. Etapa I. Calibración del monitoreo molecular de <i>P. fijiensis</i> .....	56



2.5.1.1. Identificación de síntomas de Sigatoka Negra .....	56
2.5.1.2. Cuantificación molecular de <i>P. fijiensis</i> por medio de qPCR.....	60
2.5.1.3. Identificación molecular cualitativa de <i>P. fijiensis</i> por medio de PCR convencional.....	65
2.5.2. Etapa II. Monitoreo molecular temprano de <i>P. fijiensis</i> .....	67
2.5.2.1. Cuantificación molecular temprana de <i>P. fijiensis</i> en plantas con y sin aplicación de fungicidas por medio de qPCR .....	67
2.5.2.2. Relación entre la cuantificación molecular temprana (qPCR) y el nivel de infección en plantas con y sin aplicación de fungicidas .....	71
2.6. DISCUSIÓN.....	76
2.6.1. Etapa I. Calibración de la detección y cuantificación del ADN de <i>P.</i> <i>fijiensis</i> , agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano para efectos de estimación de la infección foliar .....	76
2.6.2. Etapa II. Relación entre la detección y cuantificación del ADN de <i>P.</i> <i>fijiensis</i> y su relación con el desarrollo de los síntomas de la enfermedad Sigatoka Negra.....	81
2.7. CONCLUSIONES .....	84
2.8. RECOMENDACIONES.....	85
2.9. BIBLIOGRAFÍA.....	86
<b>CAPÍTULO III. Determinación de la relación entre factores climáticos, cantidad de ADN y la infección foliar de Sigatoka Negra (<i>Pseudocercospora fijiensis</i>) en plantas de banano (<i>Musa AAA</i>) .....</b>	<b>94</b>
3.1. RESUMEN.....	94
3.2. ABSTRACT.....	95
3.3. INTRODUCCIÓN.....	96
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
3.4.1. Descripción de la investigación .....	97
3.4.2. Variables de estudio.....	98
3.4.3. Diseño experimental .....	99

3.4.3. Análisis de datos .....	99
3.5. RESULTADOS .....	100
3.4.5.1. Condiciones climáticas del experimento .....	100
3.4.5.2. Relación entre la infección de Sigatoka Negra (SN), ADN de <i>P. fijiensis</i> y las condiciones climáticas.....	101
3.6. DISCUSIÓN.....	111
3.7. CONCLUSIONES.....	117
3.8. RECOMENDACIONES.....	118
3.9. BIBLIOGRAFÍA.....	119
<b>CAPÍTULO IV. Desarrollo de modelos predictivos de la infección foliar causada por Sigatoka Negra (<i>Pseudocercospora fijiensis</i>) en plantas de banano (<i>Musa AAA</i>) .....</b>	<b>123</b>
4.1. RESUMEN.....	123
4.2. ABSTRACT.....	124
4.3. INTRODUCCIÓN.....	125
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	126
4.4.1. Descripción de la investigación .....	126
4.4.2. Variables de estudio.....	127
4.4.3. Diseño experimental .....	128
4.4.4. Análisis de datos .....	128
4.4.4.1. Análisis estadístico de datos .....	128
4.4.4.2. Análisis de Componentes Principales (ACP) .....	129
4.4.4.2. Análisis de regresión múltiple.....	129
4.4.4.3. Validación de modelos .....	129
4.5. RESULTADOS .....	131
4.5.1. Modelos de predicción temprana de la infección de Sigatoka Negra en plantas de banano .....	131

4.5.2. Validación de modelos de predicción temprana de la infección de Sigatoka Negra en plantas de banano .....	137
4.5.3. Modelos de predicción para la cantidad de ADN de <i>P. fijiensis</i> determinada en la hoja de la planta de banano.....	140
4.5.4. Estimación del comportamiento semanal de la infección de Sigatoka Negra según el cambio de posición de la hoja en la planta de banano..	142
4.6. DISCUSIÓN.....	145
4.7. CONCLUSIONES .....	153
4.8. RECOMENDACIONES.....	155
4.9. BIBLIOGRAFÍA.....	156
<b>ANEXOS .....</b>	<b>160</b>

## LISTA DE CUADROS

Número	Título	Página
Cuadro 1.	Recopilación de modelos predictivos de la infección de Sigatoka Negra ( <i>P. fijiensis</i> ) y Sigatoka Amarilla ( <i>M. musicola</i> ) en plantas de banano y plátano, en diferentes regiones del mundo (1980 - 2018).	26
Cuadro 2.	Descripción de los tratamientos del experimento. Río Frío, 2018.	47
Cuadro 3.	Marcadores y sonda utilizados por CORBANA para la identificación y cuantificación de <i>P. fijiensis</i> en hojas de banano infectadas naturalmente mediante la técnica molecular PCR. 2018.	50
Cuadro 4.	Pruebas de calibración para la detección y cuantificación molecular de <i>P. fijiensis</i> mediante qPCR. Río Frío, 2018.	51
Cuadro 5.	Escala de Stover modificada por Gauhl (1989) para grados de severidad de Sigatoka Negra en <i>Musa</i> AAA. Fuente: Rodríguez-Gaviria y Cayón (2008).	53
Cuadro 6.	Escala de Fouré (1985) para estadíos de Sigatoka Negra en <i>Musa</i> AAA. Fuente: Rodríguez-Gaviria y Cayón (2008).	54
Cuadro 7.	Descripción de las variables determinadas en las plantas de los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.	54
Cuadro 8.	Determinación del crecimiento de las plantas durante el desarrollo del experimento. Río Frío, 2018.	68
Cuadro 9.	Curvas estándar determinadas por CORBANA durante las cuantificaciones del ADN de <i>P. fijiensis</i> en hojas naturalmente infectadas de plantas con y sin aplicación de fungicidas, desde semana 8 hasta la 23 del 2018.	68

Cuadro 10. Variables de infección de Sigatoka Negra determinadas en plantas con y sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.	74
Cuadro 11. Descripción de las variables contempladas en la relación con la infección de Sigatoka Negra ( <i>P. fijiensis</i> ). Río Frío, 2018.	98
Cuadro 12. Resumen de las variables utilizadas en los modelos predictivos de la infección Sigatoka Negra ( <i>P. fijiensis</i> ). Río Frío, 2018.	127
Cuadro 13. Análisis de Correlación lineal de Pearson entre la infección y variables climáticas en las plantas de los tratamientos (CF y SF). Río Frío, 2018.	132
Cuadro 14. Modelos utilizados para la predicción de la infección (%) de Sigatoka Negra en plantas sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.	135
Cuadro 15. Modelos utilizados para la predicción de la infección (%) de Sigatoka Negra en plantas con aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.	136
Cuadro 16. Análisis de validación de los modelos de regresión múltiple utilizados en la predicción de la infección de Sigatoka Negra en plantas con y sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.	138
Cuadro 17. Modelos de regresión lineal múltiple para predicción de la cantidad del ADN de <i>P. fijiensis</i> en la hoja posición 1 de la planta de banano. Río Frío, 2018.	141

## LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
Figura 1.	Principales destinos de las exportaciones bananeras de Costa Rica. Fuente: CORBANA (2018).	7
Figura 2.	Expansión geográfica de la enfermedad Sigatoka Negra ( <i>P. fijiensis</i> ) en el continente de América. Fuente: de Lapayre de Bellaire <i>et al.</i> (2010).	8
Figura 3.	Estructuras de reproducción de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> . (A) Conidios y conidióforo. (B) Espermacias. (C, D) Ascosporas bicelulares sin germinar y germinada respectivamente. (E) Crecimiento de una sola hifa epifilica (h) de <i>P. fijiensis</i> , estoma (s) de la hoja por donde penetran los tubos germinativos de la espora, estomatopodio (st), crecimiento intercelular (i), fase temprana de crecimiento (e). Fuente: Churchill (2011).	10
Figura 4.	Desarrollo del ciclo de vida de la enfermedad Sigatoka Negra en banano, causada por el patógeno <i>P. fijiensis</i> . Fuente: Churchill (2011).	11
Figura 5.	Etapas de la infección de Sigatoka Negra en banano (Escala de Fouré 1985). Fuente: Gómez (2013).	13
Figura 6.	Ilustración de las variaciones de la Hoja más Joven con Estrías (HMJE) de acuerdo a las condiciones epidemiológicas y el tiempo de aplicación del tratamiento químico en una plantación de banano. Fuente: de Lapayre de Bellaire <i>et al.</i> (2010).	17
Figura 7.	Variaciones semanales de la evolución de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano, y tiempo propuesto para la aplicación de fungicidas. Fuente: Fouré y Ganry (2008).	18
Figura 8.	(A) Diagrama modelo de la reacción de PCR. Las líneas continuas representan la doble hebra molde. Las líneas cortas continuas	

representan los *primers* (cebadores) y la síntesis son las líneas punteadas. (B) Visualización de los productos de PCR (bandas de color blanco) y las reacciones negativas (carril sin bandas). Marcador de peso molecular (1 Kb, Invitrogen) en el primer carril. Fuente: Vázquez-Euán *et al.* (2012).

20

Figura 9. Proceso esquemático de la amplificación de ADN por la técnica de PCR en tiempo real, modalidad de Sonda TaqMan®. Fuente: Applied Biosystems (2010).

21

Figura 10. Condición visual de las Plantas de los tratamientos (8 semanas después de siembra) y el mapa de la parcela experimental. T1= Sin aplicación de fungicidas; T2= Con aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.

47

Figura 11. (A) Representación de la hoja 1 vista por el envés para las evaluaciones de la enfermedad: P= proximal, M= media, D= distal. Río Frío, 2018. (B) Grados de apertura de la hoja candela (0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8) según Escala de Brun (1963). Fuente: Fouré y Ganry (2008).

49

Figura 12. (A) Muestreo de toda el área afectada de la parte distal derecha de la hoja (25 %). (B) Método de muestreo determinado para el monitoreo semanal en hojas posición 1. (C) Muestreo de hoja con presencia de fungicidas. (D) Muestreo de los grados de apertura de la hoja candela. (E) Ubicación de las hojas (H1 - H7) de la planta de banano. Río Frío, 2018.

51

Figura 13. Escala diagramática de infección utilizada por DOLE en la evaluación de Sigatoka Negra (*P. fijiensis*). Parte distal derecha de hojas vistas por el envés. Las flechas en color negro indican la zona evaluada. Río Frío, 2018.

53

Figura 14. Evaluación visual de síntomas de Sigatoka Negra en las hojas de plantas naturalmente infectadas y en ausencia de fungicidas, vista

por el envés. A-G = Hojas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. P= proximal; M= media; D= distal. Río Frío, 2018. 56

Figura 15. Evaluación de la infección de Sigatoka Negra en las porciones de las hojas de plantas naturalmente infectadas en ausencia de aplicación de fungicidas. D= distal; M= media; P= proximal. Río Frío, 2018. 57

Figura 16. Identificación de estructuras de *P. fijiensis* inoculadas artificialmente en hojas posición 1 y síntomas tempranos del proceso de infección de Sigatoka Negra, utilizando tinción con Rosa Bengala. (A) Ascosporas no germinadas sin presencia de fungicida protectante en la hoja (0h después de inoculado), x400; (B) Ascosporas no germinadas con aplicación de fungicida protectante en la hoja (48h después de inoculado), x400; (C, D) Ascosporas germinadas sin fungicida protectante en la hoja (48h después de inoculado), x200; (E, G) Estadíos uno en hoja candela 0.4 y hoja 1 (x7); (F, H) Estadío uno en hoja candela 0.4 y hoja posición 1 (x100). Río Frío, 2018. 59

Figura 17. Calibración de la cuantificación molecular de *P. fijiensis*. (A) Regresión entre la curva estándar y los ciclos umbrales ( $C_t$ ) de cantidades conocidas de ADN de *P. fijiensis*; (B, C y D) Cuantificación molecular para determinar la zona de muestreo de la hoja naturalmente infectada. NA= No Amplificación; C1= Hoja candela sana; C2= Hoja 1 con aplicación de fungicidas; C3= Hoja 1 sin aplicación de fungicidas; C4= Hoja 1 con inoculación artificial del patógeno. Río Frío, 2018. 61

Figura 18. Cuantificación molecular de *P. fijiensis* en los grados de apertura de la hoja candela naturalmente infectada, en plantas con y sin aplicación de fungicidas. (A) Curva de los Ciclos de Umbral utilizados en la cuantificación; (B) Curva de la cantidad de ADN de *P. fijiensis*; HMF= Hoja de muestreo foliar. Río Frío, 2018. 64



- Figura 19. Gel de agarosa (1 %) de los productos de PCR para los marcadores específicos de *P. fijiensis*:  $\beta$ -tubulina= MFBF y MFBRtaq (134 pb); ITS= MF137 y R635 (1018 pb). M= Marcador molecular (100 pb); (-) = Control negativo; (+) = Control positivo (*P. fijiensis*); P1 a P3= Hojas posición 1 de plantas naturalmente infectadas; ▼ = Valores en porcentaje corresponden al resultado de identificación por medio de análisis bioinformático de los productos de PCR secuenciados por CORBANA. 66
- Figura 20. Estimación de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en hojas naturalmente infectadas en plantas con y sin aplicación de fungicidas. Datos agrupados de 16 semanas de muestreo molecular temprano (de semana 8 a la 23). Río Frío, 2018. 69
- Figura 21. (A) Curvas de amplificación de la detección molecular temprana de *P. fijiensis* en plantas naturalmente infectadas y de las curvas estándar. (B, C) Gel de agarosa (1 %) de los productos de PCR para los marcadores específicos de *P. fijiensis*: MFBF y MFBRtaq (134 pb); MF137 y R635 (1018 pb). M= Marcador molecular (100 pb); CN= Control negativo. Líneas E1 a E6 corresponden al ADN estándar y líneas P1 a P6 corresponden a muestras de hojas posición 1 naturalmente infectadas con cantidades de ADN de *P. fijiensis* similares a la curva estándar. 70
- Figura 22. Relación entre la cuantificación temprana del ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1 (H1) y la infección foliar (4 SDM). (A) SF= Sin fungicidas; (B) CF= Con fungicidas, P= Protectantes, S= Sistémicos; (C) Condiciones climáticas de precipitación (mm y horas) durante el desarrollo del estudio. IMF= Inicio del muestreo foliar. Río Frío, 2018. 73
- Figura 23. Valores promedio del avance semanal de los síntomas visuales de la enfermedad Sigatoka Negra en la hoja donde se realizó el monitoreo molecular temprano. Río Frío, 2018. 75

- Figura 24. (A) Estación agroclimatológica marca ADCON<sup>®</sup>, ubicada en Río Frío, Sarapiquí. Sensores: a= Velocidad y dirección del viento; b= Pluviómetro; c= Radiación solar; d=Temperatura y humedad relativa; e= Humedad foliar. (B) Esquema de la relación entre las variables climáticas y la severidad en las hojas de la planta. C= Hoja candela; H1= Hoja 1; H4-H8= Rango de posición de la hoja durante 4, 5, 6 y 7 semanas de evaluación. SDM= Semanas después de muestreo. Río Frío, 2018. 97
- Figura 25. Condiciones climáticas registradas desde febrero a julio del 2018. Río Frío, 2018. 100
- Figura 26. Relación entre el avance de la infección (4 a 7 SDM) de Sigatoka Negra en las hojas del monitoreo molecular temprano y las condiciones climáticas de precipitación y temperaturas presentes durante el desarrollo del estudio. SDM= Semanas Después de Muestreo IMF= Inicio del Muestreo Foliar; FMF= Finalización del Muestreo Foliar. Programa de aplicación de fungicidas: P= Fungicidas Protectantes; S= Fungicidas Sistémicos. Río Frío, 2018. 102
- Figura 27. Estado de las plantas del tratamiento sin aplicación de fungicidas (T1) desde febrero a julio del 2018. Río Frío, 2018. 104
- Figura 28. Relación entre clima, ADN de *P. fijiensis* y la infección (4 SDM) de SN en plantas sin fungicidas. Río Frío, 2018. 105
- Figura 29. Estado de las plantas del tratamiento con aplicación de fungicidas (T2) desde febrero a julio del 2018. Río Frío, 2018. 106
- Figura 30. Relación entre clima, ADN de *P. fijiensis* y la infección (4 SDM) de SN en plantas con fungicidas. Río Frío, 2018. 107
- Figura 31. Evaluación final de la infección de Sigatoka Negra en las hojas de monitoreo molecular temprano (7 SDM) y su relación con las condiciones climáticas presentes durante la semana del desarrollo

de hoja candela. SF= Tratamiento sin fungicidas (A, C, E y G); CF= Tratamiento con fungicidas (B, D, F y H). SHC= Semana de desarrollo de la hoja candela; SMF= Semana de muestreo foliar; SEV= Semana de evaluación final. P= Precipitación; Tp Máx= Temperatura promedio máxima; Tp Mín= Temperatura promedio mínima; HR= Humedad relativa. Río Frío, 2018. 109

Figura 32. Relación entre la cantidad de ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1 y las condiciones climáticas cuando la hoja estuvo en su estado de hoja candela en plantas de los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018. 110

Figura 33. Proceso de generación y extracción de conocimiento en bases de datos para generar modelos de predicción. Fuente: Freitez 2007. 126

Figura 34. Análisis de Componentes Principales (ACP) entre las variables predictoras y la infección (%) de Sigatoka Negra. (A) Tratamiento sin aplicación de fungicidas; (B) Tratamiento con aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018. 134

Figura 35. Comparación entre la infección real de Sigatoka Negra y la infección estimada por los modelos de regresión múltiple. (A) Tratamiento sin aplicación de fungicidas; (B) Tratamiento con aplicación de fungicidas. IMF= Inicio del muestreo foliar; VP= Valor de predicción. Río Frío, 2018. 139

Figura 36. Comparación entre la cantidad real del ADN de *P. fijiensis* y la estimada utilizando modelos de regresión lineal múltiple para la hoja posición 1 de la planta de banano. SF= Tratamiento sin aplicación de fungicidas; CF= Tratamiento con aplicación de fungicidas;  $R^2$  aj=  $R^2$  ajustado; S (%)= Sesgo; p= probabilidad de Wilcoxon. Río Frío, 2018. 142

Figura 37. Regresión polinomial para la estimación de la infección (%) de Sigatoka Negra a 5, 6 y 7 SDM mediante el valor de predicción temprana de la infección 4 SDM (%) en plantas de banano. SF= Tratamiento sin aplicación de fungicidas (A, B y C); CF= Tratamiento con aplicación de fungicidas; SDM= Semanas después de muestreo (E, F y G). Río Frío, 2018.

144

## LISTA DE ANEXOS

<b>Número</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Anexos 1.	Cronograma de actividades de la ejecución del experimento en Río Frío, 2018.	160
Anexos 2.	Imagen aérea del experimento tomadas con un Drone por el Ing. Hubert Gutiérrez (DOLE), momento en que las plantas tenían 10 semanas de edad. Río Frío, 2018.	161
Anexos 3.	Escala de Stover modificada por Gauhl (1989) para la evaluación de la incidencia y severidad de Sigatoka Negra en Musáceas.	162
Anexos 4.	Sistema de calificación de la severidad de Sigatoka Negra en Musáceas. Fuente: Freitez (2007).	162

# **CAPÍTULO I. El cultivo de banano (*Musa AAA*), dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*) y uso de herramientas para su detección, predicción y combate**

## **1.1. RESUMEN**

El cultivo de banano es susceptible a enfermedades causadas por bacterias, fitonematodos, así como hongos, entre ellos *Pseudocercospora fijiensis*, el cual es agente causante de la enfermedad conocida como Sigatoka Negra. Esta enfermedad está ampliamente distribuida en todo el mundo y es considerada el principal problema fitosanitario en la producción de banano por causar daños como: reducción del tejido fotosintético, maduración prematura del fruto, pérdida de peso del racimo, entre otros. Las ascosporas son la principal vía de infección por la fácil diseminación por viento y agua; penetran vía estomática una vez que se depositan sobre la superficie del envés de la hoja candela, donde las condiciones de altas precipitaciones y temperaturas entre 26-28°C influyen directamente en el desarrollo de la enfermedad. Las herramientas visuales son las más utilizadas para la evaluación y determinación de variables tales como el promedio ponderado de infección (PPI), hoja más joven enferma (HMJE), hoja más joven manchada (HMJM), hoja más joven libre de estrías (HMJLE) y estado de evolución de la enfermedad, las cuales son las más utilizadas para la programación de aplicación de fungicidas protectantes y sistémicos. Por otro lado, se han desarrollado modelos de predicción de la severidad, mediante la integración de variables climáticas como precipitación, humedad relativa, temperatura y radiación solar. En las últimas décadas se han realizado estudios para la detección y cuantificación molecular específica del hongo *P. fijiensis* en hojas naturalmente infectadas con el diseño de marcadores específicos para las regiones ITS y  $\beta$ -tubulina mediante las sensibles técnicas de biología molecular como las del PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

**Palabras clave:** *Musa AAA*, Sigatoka Negra, *Pseudocercospora fijiensis*, detección, predicción, combate.

## 1.2. ABSTRACT

Banana crops are susceptible to diseases caused by bacteria, phytonematodes, as well as fungi, including *Pseudocercospora fijiensis*, which is the causing agent of the disease known as Black Sigatoka (black leaf streak). This disease is widely distributed throughout the world and is considered to be the main phytosanitary problem in banana production, causing damages such as: leaf loss, premature ripening of the fruit, and loss of cluster weight, among others. Ascospores are the main means of infection due to the easy dissemination by wind and water; they enter stomata once they are deposited on the underside of the cigar leaf, where conditions of high rainfall and temperatures between 26-28 °C directly influence the development of the disease. Visual tools are most used for evaluating variables such as the weighted average of infection (PPI), sick younger leaf (HMJE), younger leaf spotted (HMJM), younger leaf free of stretch marks (HMJLE) and state of evolution of the disease, which are the most used for the programming of application of protectant and systemic fungicides. On the other hand, models for predicting of severity have been developed by integrating climatic variables such as precipitation, relative humidity, temperature and solar radiation. In recent decades, studies have been conducted for the detection and quantification of the fungus *P. fijiensis* in naturally infected leaves with the design of specific markers for the ITS and  $\beta$ -tubulin regions through RT-PCR ( Polymerase chain reaction).

**Key words:** *Musa* AAA, Black Sigatoka, *Pseudocercospora fijiensis*, detection, prediction, combat.

### 1.3. INTRODUCCIÓN

La actividad bananera ha tenido una importante evolución desde los conceptos de la revolución verde hasta llegar a los más actualizados, donde se fomentan las prácticas agrícolas amigables con el medio social y ambiental para lograr una sostenibilidad de la producción (Soto 2014).

La producción de banano (*Musa AAA*) se maneja bajo condiciones ambientales primordiales para su adecuado desarrollo productivo, con temperaturas adecuadas en un ámbito entre 20°C a 35,5°C, altitudes que pueden variar desde cero a 300 msnm, precipitaciones mensuales promedio en un ámbito de 120 a 180 mm, y luminosidad de 1.000 a 1.500 horas luz de brillo solar acumulada por año, vientos que no superen los 30 km/h y la humedad relativa debe ser mayor al 80 %. Esta última condición de humedad es de suma importancia a tomar en cuenta ya que se favorecen las enfermedades fungosas en su desarrollo y dificulta su combate (Vizcaino y Betancourt 2013).

CORBANA (2011) menciona que, debido a la productividad y propiedades de calidad del fruto, las variedades de banano del subgrupo Cavendish son las de mayor utilización actualmente, aunque son susceptibles a problemas fitosanitarios como los nematodos (*Radopholus similis*) y la Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*). El manejo integrado del hongo en este cultivo es de gran importancia para reducir la totalidad de las fuentes de inóculo que ayuden a desarrollar y dispersar la enfermedad de la Sigatoka Negra (Orozco-Santos *et al.* 2008). Martínez y colaboradores (2011) explican que las condiciones ambientales de altas precipitaciones, alta humedad relativa y temperaturas óptimas crean una condición adecuada para su desarrollo y las corrientes de aire dispersan las estructuras de los patógenos a distancias cercanas en la plantación.

La enfermedad Sigatoka Negra es el principal problema fitopatológico del cultivo. Afecta rápidamente el tejido foliar al reducir la actividad fotosintética y en caso de ausencia de control puede causar la pérdida de más del 50 % del peso del racimo, deteriora la calidad del fruto por problemas de maduración de los mismos



en campo y durante el proceso de transporte a los mercados de destino (Martínez *et al.* 2011).

Por otro lado, el impacto ambiental que genera el control de la enfermedad es de suma importancia, ya que la aplicación de fungicidas representa el 83 % del total de agroquímicos usados en el cultivo. Se realizan entre 45 y 52 ciclos de aplicación de fungicidas por hectárea por año y estos pueden aumentar dependiendo del comportamiento de la enfermedad en función de las condiciones climáticas y representando hasta el 27 % del costo total de producción que oscila entre \$600 a \$1800 por ha por año (Ortiz 2001, Ortiz *et al.* 2002, Bach 2007, Martínez *et al.* 2011, CORBANA 2011).

En Costa Rica para los muestreos de la Sigatoka Negra se utiliza el método de Stover (1980) modificado por Gauhl (1989), este es un procedimiento aceptado internacionalmente para evaluar la incidencia y la severidad de la enfermedad. Utiliza una serie de índices y variables que permiten cuantificar el daño en la plantación a causa de esta enfermedad (Lazo *et al.* 2012). Otro método es el desarrollado por Ganry y Meyer (1972ab) denominado “método de combate racional del preaviso biológico” y es también usado para determinar el comportamiento de la enfermedad y para su control mediante la aplicación de fungicidas (Pérez-Vicente *et al.* 2000).

Actualmente existe una problemática con el manejo de la enfermedad Sigatoka Negra, debido al efecto del cambio climático y al uso constante de fungicidas mono-sitio y bi-sitio que ocasionaron resistencia por parte del patógeno en las plantaciones comerciales. En las últimas décadas se ha investigado con nuevas metodologías como alternativas en detección y modelación temprana de la enfermedad, así como su relación con condiciones ambientales que permitan la estimación de niveles de infección en las plantaciones. Esto debido a que los sistemas de preaviso biológico utilizados para el monitoreo del avance de la enfermedad perdieron vigencia por las condiciones mencionadas de resistencia (Romero 1996, Guzmán 2003).

En la actualidad existen otras técnicas como la detección molecular, que son rápidas y ampliamente utilizadas en otros cultivos (Churchill 2011). Una de ellas - el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) - consiste en la amplificación de secuencias específicas en el genoma, que sirven como marcadores moleculares para la identificación de genes definidos del organismo en estudio. Otra técnica de uso convencional en fitopatología es la microscopía de luz para observar y cuantificar las estructuras (ascosporas y conidios) del patógeno en la superficie de la hoja de banano (Churchill 2011).

Ortiz *et al.* (2002) menciona la importancia de realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad en las plantaciones de banano para su uso en modelos de predicción temprana (Gómez 2017), con el objetivo de reducir la frecuencia de aplicaciones de fungicidas, así como obtener un uso más eficaz y eficiente de las moléculas fungicidas disponibles en el mercado.

Por lo anterior, en este Capítulo se realizará una revisión de la literatura sobre la dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra, los sistemas utilizados para su monitoreo y predicción, así como las recientes técnicas en biología molecular (PCR) utilizadas para la detección y cuantificación temprana del patógeno causante de la Sigatoka Negra (*P. fijiensis*) en las plantas de banano.

## 1.4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.4.1. Antecedentes del cultivo de banano

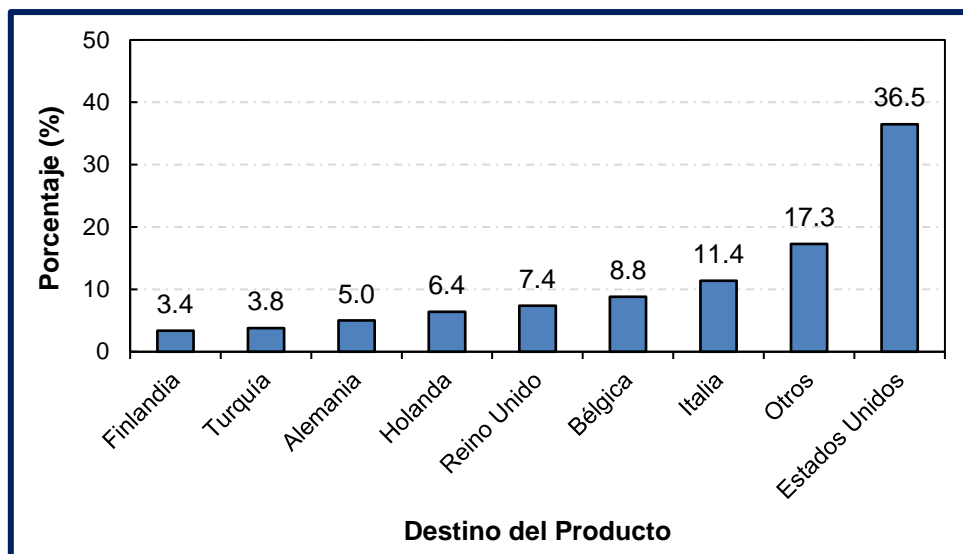
El cultivo de banano pertenece al orden *Zingiberales*, familia *Musaceae*, género *Musa*, y es originario de la región del Extremo Oriente desde India hasta Filipinas (Soto 1990, Robinson 1996, Robinson y Galán 2012, Soto 2014). Las especies silvestres *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B) dieron origen a la mayoría de los bananos comestibles (Simmonds y Shepherd 1955, Robinson y De Villiers 2007, Robinson y Galán 2012).

Soto (2014) indica que el banano es una planta monocotiledónea, herbácea y perenne, con un desarrollo adecuado para la producción en las regiones tropicales donde predominan las condiciones húmedas y cálidas. Debido a ser un cultivo perenne por su rápido crecimiento puede ser cosechado durante todo el año y es una de las principales economías por la fuente importante de ingresos en países de África, Asia, América Latina y del Caribe (Ortiz y Vuylsteke 1996, Soto 2014).

Arias *et al.* (2004) mencionan que América Latina (Ecuador, Honduras y Costa Rica) y Asia (Filipinas) son las principales regiones productoras de banano Cavendish, donde se estima que su producción aumentó en un 30 % durante los años 90's, debido al cambio de cultivares del sub-grupo Gros Michel al sub-grupo Cavendish. Por otro lado, Gowen (1995) indica que la producción mundial aproximada de banano es de más de 50 millones de toneladas al año y en conjunto con el plátano son la principal fuente de alimento para al menos 400 millones de personas (Ortiz y Vuylsteke 1996).

### 1.4.2. Importancia de la producción de banano en Costa Rica

En Costa Rica la industria bananera representa el 33,2 % de las exportaciones agrícolas, con el 2 % de participación del PIB nacional, una generación de empleo del 6,0 % y una generación en divisas de \$USD 998 millones anuales. Los principales mercados de destino del producto nacional son la Unión Europea (55,2 %) y Estados Unidos (36,5 %) según datos reportados por CORBANA (2018).



**Figura 1.** Principales destinos de las exportaciones bananeras de Costa Rica.  
Fuente: CORBANA (2018).

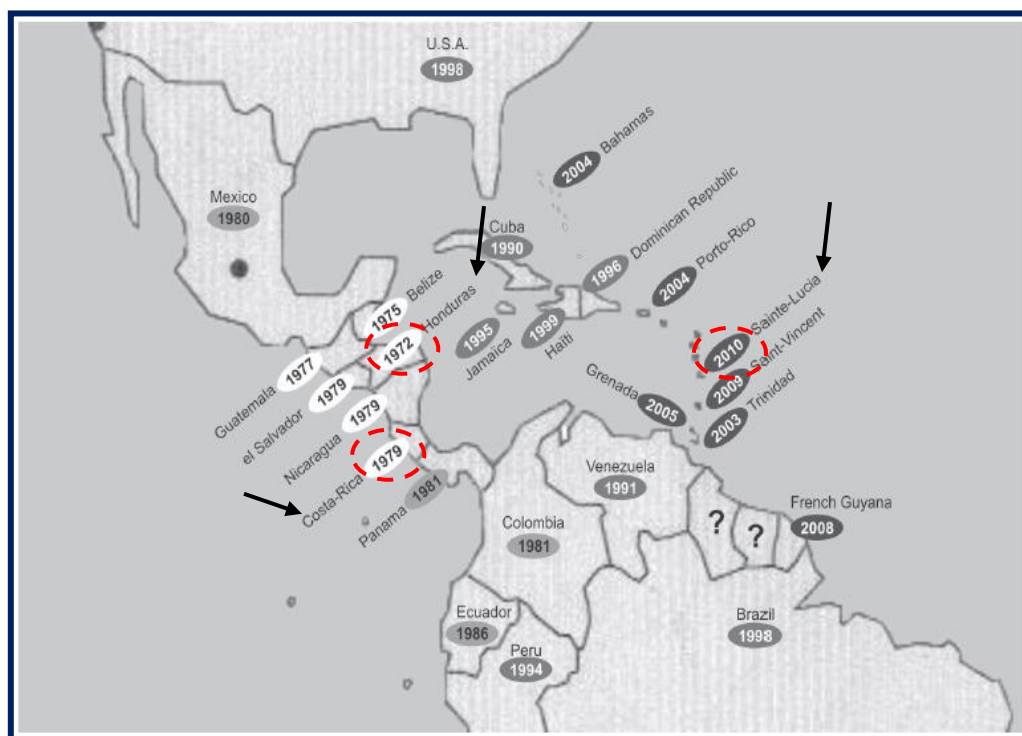
La industria bananera es un motor económico importante para el país. Las plantaciones en Costa Rica representan el 1 % del territorio nacional, un área de aproximadamente 42.410 ha con una productividad promedio de 2.847 cajas por hectárea al año (2010-2016), generando 40.000 empleos directos y cerca de 100.000 empleos indirectos (CORBANA 2018).

### 1.4.3. Generalidades de la enfermedad Sigatoka Negra

#### 1.4.3.1. Distribución geográfica, ecología y condiciones ambientales de la enfermedad Sigatoka Negra

La enfermedad de Sigatoka Negra, causada por el patógeno *Pseudocercospora fijiensis*, se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y es considerada la mayor problemática fitosanitario del cultivo de banano (Agrios 2005, Soto 2014). Los primeros reportes provienen de las islas Fiji (Costa sudeste de Viti Levu) en 1963 (Firman 1972, Stover 1980, Mourichon *et al.* 1997, Ploetz 2001, Manzo-Sánchez *et al.* 2005, Soto 2014), por consecuencia se ha registrado una amplia presencia del patógeno en el Pacífico, regiones de África y Asia (Mourichon *et al.* 1997, Ploetz 2001, Soto 2014).

En 1972 (Figura 2) se descubrió la enfermedad en América Latina, siendo Honduras el inicio de la diseminación por toda América Central, Colombia y Ecuador y en el año 1979 se reportó en Costa Rica la presencia del patógeno (Alarcón y Jiménez 2012, Soto 2014). Soto (2014) indica que ningún país bananero está libre de la enfermedad a excepción de las Islas Canarias que gozan de la ausencia del patógeno y están obligados a evitar la entrada por medio de estrictos protocolos fitosanitarios.



**Figura 2.** Expansión geográfica de la enfermedad Sigatoka Negra (*P. fijiensis*) en el continente de América. Fuente: de Lapayre de Bellaire *et al.* (2010).

Las regiones tropicales y subtropicales del mundo tienen las condiciones idóneas para el desarrollo de la enfermedad Sigatoka Negra. Este patógeno requiere de condiciones climáticas óptimas de altas precipitaciones (1.400 mm anuales), temperaturas que oscilen entre los 23 °C a 28 °C y humedad relativa mayor a 80 % (Guzmán 2003, Torrado-Jaime y Castaño-Zapata 2008, Alarcón y Jiménez 2012, Soto 2014). Por otro lado, Robinson y Galán (2012) mencionan que las zonas bananeras de Costa Rica presentan condiciones idóneas para la

agresividad de la Sigatoka Negra en las plantaciones y la misma puede presentar alteraciones como consecuencia de las variaciones climáticas que presentan las zonas de producción.

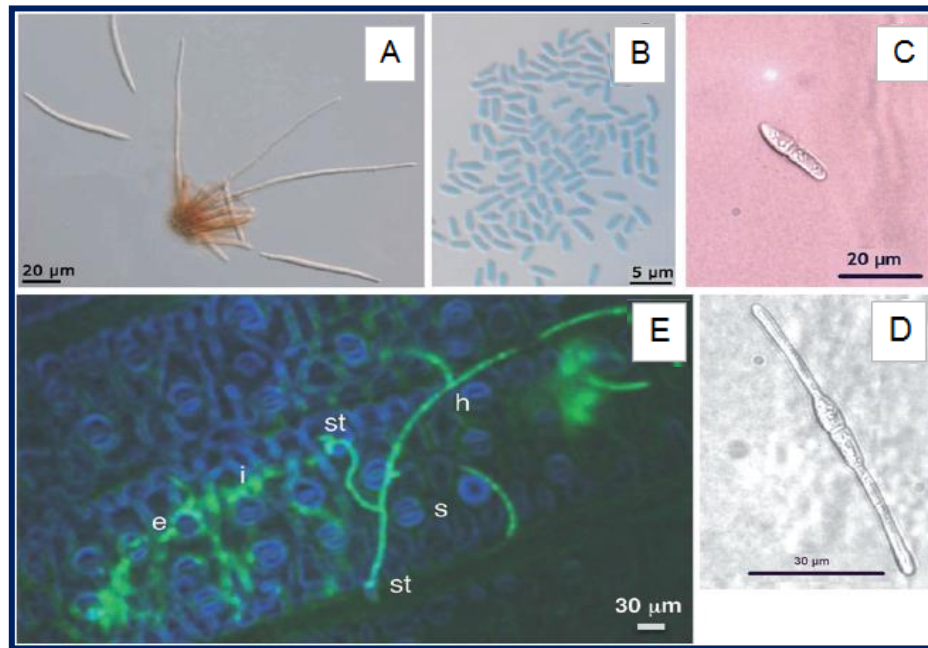
#### **1.4.3.2. Biología de la enfermedad Sigatoka Negra**

Taxonomía. Según lo reportado la enfermedad de la Sigatoka Negra es causada por el hongo ascomicete en su estado teleomorfo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, con *Pseudocercospora fijiensis* representando el estado anamorfo (Queiroz *et al.* 2013, Soto 2014). Se ubica en el filo Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Capnodiales, familia Mycosphaerellaceae, género *Mycosphaerella* (Agrios 2005, Webster y Weber 2007, Churchill 2011). Mientras que el estado anamorfo se ubica la clase Hyphomycetae (Manzo-Sánchez *et al.* 2005, Crous *et al.* 2009, Liberato *et al.* 2009, Churchill 2011).

Morfología y ciclo patológico. En las plantaciones de banano la enfermedad Sigatoka Negra requiere la presencia de sus dos estados (anamorfo y teleomorfo) para completar su ciclo de vida (Marín *et al.* 2003, Webster y Weber 2007, Churchill 2011).

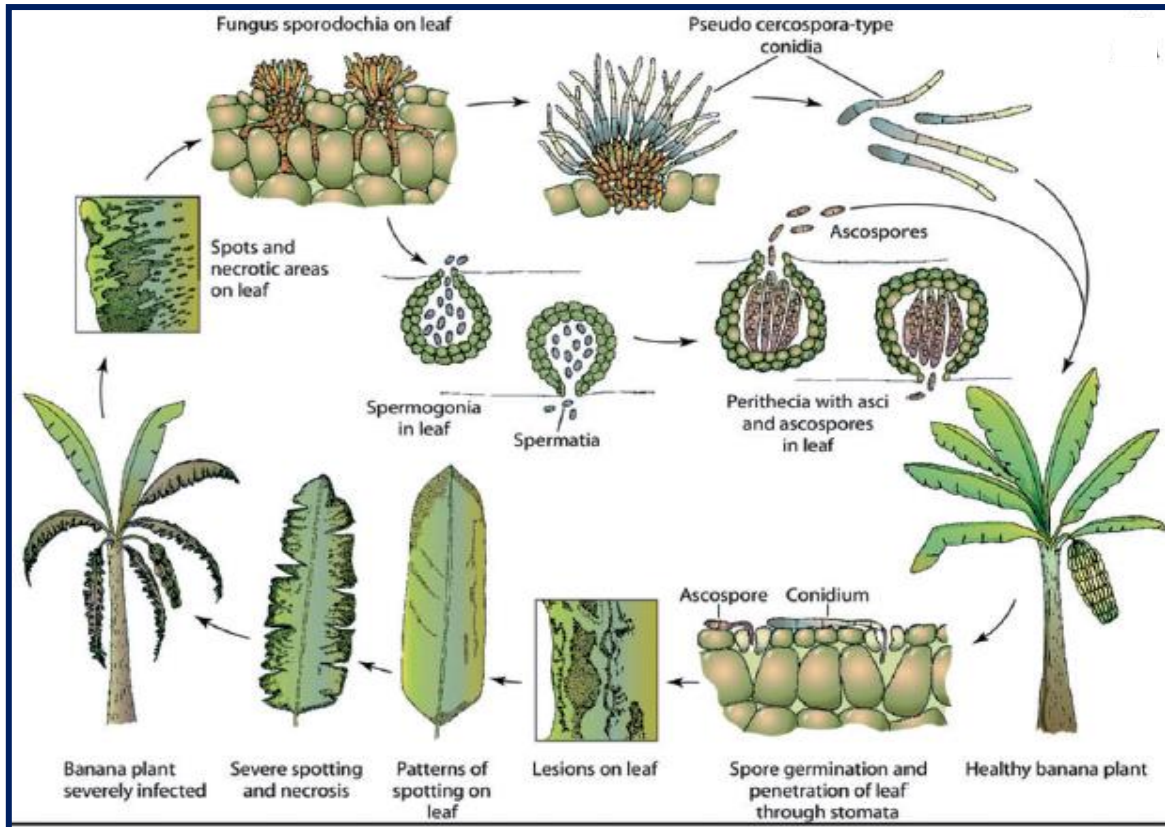
Presenta células sexuales llamadas ascosporas (Figura 3C) producidas en los pseudotecios (peritecios) cuando ocurre la fertilización de las ascas por las espermacias. Las ascosporas son incoloras (hialinas), bicelulares, ligeramente constrictas en el septo y de forma fusiforme clavada; miden 11,5 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud y de 2,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de ancho (Meredith y Lawrence 1969, Churchill 2011). Las ascosporas son consideradas como el principal agente de diseminación de la enfermedad a largas distancias entre plantaciones (Stover 1980, Nelson 2008, Alarcón y Jiménez 2012, Álvarez *et al.* 2013, Viljoen *et al.* 2017). Por otro lado, los conidios (Figura 3A) son las células asexuales formados sobre los conidióforos. Son largos y presentan tres o más septos de color pálido y lisos (Churchill 2011), miden de 30 a 132  $\mu\text{m}$  de longitud y de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$  en su parte más ancha (Meredith y Lawrence 1969). Los conidios son importantes debido a la diseminación local o de corta distancia en las plantaciones, mediante la lluvia y el viento en menor magnitud

(Stover 1980, Marín *et al.* 2003, Agrios 2005, Alarcón y Jiménez 2012, Álvarez *et al.* 2013, Viljoen *et al.* 2017).



**Figura 3.** Estructuras de reproducción de *Pseudocercospora fijiensis*. **(A)** Conidios y conidióforo. **(B)** Espermacias. **(C, D)** Ascosporas bicelulares sin germinar y germinada respectivamente. **(E)** Crecimiento de una sola hifa epifilica (**h**) de *P. fijiensis*, estoma (**s**) de la hoja por donde penetran los tubos germinativos de la espora, estomatopodio (**st**), crecimiento intercelular (**i**), fase temprana de crecimiento (**e**). Fuente: Churchill (2011).

Según Agrios (2005), Henderson *et al.* (2006) y Churchill (2011) el ciclo de la enfermedad por *P. fijiensis* es de cuatro etapas distintas (ver Figura 4): germinación de la espora, penetración del hospedero, desarrollo de síntomas y la producción de esporas. La infección es ramificada porque ocurre tanto con esporas sexuales como asexuales y estas no se presentan de forma alternada (Zadocks y Shein 1979). Conde-Ferrández *et al.* (2010) indican que la variabilidad y evolución del hongo es consecuencia de la reproducción sexual; por otro lado, Pérez-Vicente (2009) y Churchill (2011) mencionan que *M. fijiensis* es un hongo sexual heterotálico y la fecundación ocurre por medio de talos separados (Mourichon y Zapater 1990).



**Figura 4.** Desarrollo del ciclo de vida de la enfermedad Sigatoka Negra en banano, causada por el patógeno *P. fijiensis*. Fuente: Churchill (2011).

Las esporas (ascosporas o conidios) requieren de la absorción de agua para iniciar el proceso de germinación al momento de llegar a colonizar la superficie de las hojas jóvenes, por el envés de la hoja candela (Marín *et al.* 2003), e ingresar por la vía estomática por medio de los tubos germinativos (Figura 3E y Figura 4). Tienen una mayor probabilidad de alcanzar y penetrar vía estomas, debido a estar en mayor densidad en el envés de las hojas de las musáceas (Cayón *et al.* 1991, Washington *et al.* 1998, Sandoval y Muller 1999, Soto 2014). La etapa de germinación y penetración en el hospedero tiene una duración de 2 días a 4 días. Los síntomas iniciales (estadio 1 y 2) son visibles a partir de la hoja 3 entre los 10 y 30 días posterior a la infección, mientras que en los estadios tempranos de la enfermedad (estadio 2 a 5) ocurre la producción y liberación de los conidios (28 días post-infección). Los estadios de evolución de la enfermedad son más severos (estadios 5 y 6) a 49 días post-infección, durante este momento ocurre la liberación de las



ascosporas. Tanto conidios como ascosporas son infectivas produciendo el mismo tipo de macha y el posterior desarrollo de la enfermedad (Meredith y Lawrence 1969, Stover 1980, Marín *et al.* 2003, Agrios 2005, Nelson 2008, Alarcón y Jiménez 2012, Álvarez *et al.* 2013, Viljoen *et al.* 2017).

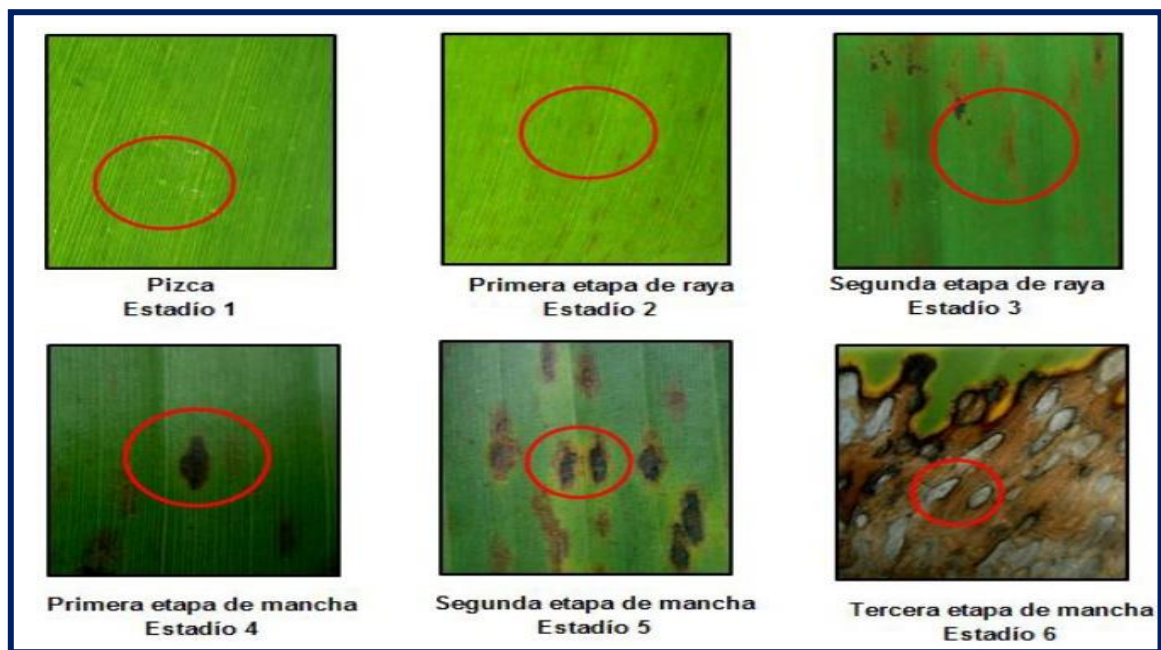
Epidemiología. Torrado-Jaime y Castaño-Zapata (2008) mencionan que la agresividad de la enfermedad se ve favorecida bajo ciertas condiciones climáticas como precipitaciones por encima de los 1.400 mm anuales, humedad relativa alta (>80 %) y temperatura promedio entre 23 °C a 28 °C; por lo que Robinson y Galán (2012) afirman que las condiciones climáticas presentes en las zonas bananeras de Costa Rica son las idóneas para el adecuado desarrollo de la enfermedad Sigatoka Negra.

La diseminación de ascosporas ocurre por medio del viento en distancias de hasta 100 km, mientras que por efecto del salpique del agua los conidios llegan a colonizar la hoja en desarrollo (hoja candela) y hojas ya desplegadas respectivamente. La principal fuente de inóculo en las hojas jóvenes son las ascosporas debido a que las concentraciones en el medio ambiente son de 10 a 100 veces mayor a los conidios y también por su fácil diseminación por medio del viento (Parnell *et al.* 1998, Guzmán 2003, Marín *et al.* 2005, Alarcón y Jiménez 2012, Álvarez *et al.* 2013).

Las ascosporas y conidios requieren de temperaturas óptimas de entre 25 °C a 28 °C para su máxima germinación, 27 °C es considerado promedio óptimo, pero mientras las ascosporas requieren de humedad relativa de 98 % a 100 %, el ámbito para los conidios es más amplio de 92 % a 100 % (Guzmán 2003, Aguirre *et al.* 2012). El proceso de germinación ocurre en un tiempo menor a dos horas, posteriormente la penetración del tubo germinativo por la vía estomática ocurre durante una semana (Alarcón y Jiménez 2012). Aguirre *et al.* (2012) determinaron que temperaturas menores a 20 °C reducen la velocidad de crecimiento de los tubos germinativos. Guzmán (2003) menciona que la viabilidad de los conidios sobre la superficie de la hoja puede ser mayor a los 60 días. Por otro lado, las estructuras

de diseminación se ven afectadas por la exposición (6 horas) a la radiación ultravioleta (250 a 270 nm) y las altas temperaturas (>30 °C), debido a la desnaturalización de las proteínas presentes en la pared de las esporas del patógeno (Rotem *et al.* 1985, Rotem y Aust 1991, Parnell *et al.* 1998).

Sintomatología. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen en el envés de la hoja, en especial en el margen derecho distal de la misma. Se presenta como manchas longitudinales de color marrón oscuro; de 1 mm a 2 mm de largo, y aumentan de tamaño hasta formar lesiones necróticas con halos amarillos y con centro de color gris claro. Estas lesiones pueden llegar a destruir grandes áreas del tejido foliar (Mourichon *et al.* 1997). Álvarez y colaboradores (2013) mencionan que la evolución de la enfermedad normalmente ocurre a través de etapas, donde se reconocen seis estados o etapas según la escala de Fouré (1985), los cuales se clasifican como: una etapa de puntos, dos etapas de raya, y tres etapas de mancha (Meredith y Lawrence 1969, Marín *et al.* 2003, Manzo-Sánchez *et al.* 2005, Álvarez *et al.* 2013, Ganry *et al.* 2012, Soto 2014). Los seis estados de clasificación del desarrollo de síntomas de la enfermedad se ilustran en la Figura 5.



**Figura 5.** Etapas de la infección de Sigatoka Negra en banano (Escala de Fouré 1985). Fuente: Gómez (2013).

Los síntomas de la Sigatoka Negra pueden variar en su evolución en función del estado de desarrollo de la planta, variedad del hospedante y severidad del ataque (Álvarez *et al.* 2013). Según Marín y colaboradores (2003) indican que el periodo del desarrollo de rayas a manchas necróticas está muy ligado a los factores climáticos, presentando variaciones estacionales durante el año.

#### **1.4.3.3. Manejo de la enfermedad Sigatoka Negra**

El manejo integrado de la agresividad de la enfermedad Sigatoka Negra en las plantaciones es actualmente un objetivo prioritario en Costa Rica y en diferentes latitudes del mundo donde se cultiva banano, para producir cantidades de banano de alta calidad y productividad (Patiño *et al.* 2006), se requiere de un manejo integrado:

Combate Cultural. Es la implementación o ejecución de una serie de prácticas que logren disminuir el desarrollo de *Pseudocercospora fijiensis* mediante la modificación del ambiente con el objetivo de afectar la reproducción, diseminación e infección del tejido sano de las hojas por parte de las estructuras (ascosporas y conidios) del patógeno. En otras palabras, se busca reducir la fuente de inóculo y realizar una modificación del microclima que favorece el desarrollo del hongo (Marín *et al.* 2003, Agrios 2005, Orozco *et al.* 2013).

Martínez *et al.* (2011) indica que dentro de este concepto se ubican las prácticas como el control de malas hierbas, el drenaje adecuado, la nutrición balanceada, la población y distribución de plantas. Dentro de las prácticas más frecuentes y de mayor importancia están la deshoja sanitaria detallada como el despunte y cirugía, que a intervalos de controles semanales (frecuentes) logra reducir la agresividad (severidad) de la enfermedad Sigatoka Negra en las plantaciones (Pérez-Vicente 2009, Martínez *et al.* 2011, Alarcón y Jiménez 2012).

Combate químico. El uso de fungicidas de manera intensiva en las plantaciones resulta indispensable y es la principal herramienta para alcanzar una productividad rentable de la plantación mediante un manejo eficiente de la enfermedad (Martínez

*et al.* 2011, Alarcón y Jiménez 2012). Estos fungicidas son agrupados en tres categorías de acuerdo a su forma de acción: fungicidas protectantes o multisitio, fungicidas de acción sistémica local y fungicidas sistémicos, ya sea monositio o bisitio, según el punto de inhibición en las enzimas blanco (Gómez 2013).

Los fungicidas protectores se depositan sobre la superficie de las hojas creando una capa, para así inhabilitar la germinación y penetración de las esporas a través de estomas en la hoja. Su modo de acción es multisitio, generando un bajo o nulo riesgo de resistencia por parte del patógeno, entre estos se incluyen fungicidas como el mancozeb y el clorotalonil (Martínez *et al.* 2011, Orozco *et al.* 2013).

Por otra parte, los fungicidas de acción sistémica tienen la capacidad de penetrar los tejidos y reducir el crecimiento del patógeno cuando se encuentra dentro de la hoja, teniendo en términos simples un “efecto curativo” al llegar a inhibir específicamente uno o más sitios de enzimas clave en el metabolismo del patógeno. Se incluyen los fungicidas de grupos de los benzimidazoles, triazoles, estrobirulinas, aminas y anilopirimidinas (Churchill 2011, Martínez *et al.* 2011). Actualmente *P. fijiensis* ha desarrollado resistencia a los tres primeros fungicidas sistémicos ya mencionados y una de las estrategias recomendables con el uso de nuevas moléculas para el control de la enfermedad es la rotación de estas en los programas de aplicación (Martínez *et al.* 2011, Orozco *et al.* 2013).

#### **1.4.4. Herramientas desarrolladas para el monitoreo visual y el combate de la enfermedad Sigatoka Negra en las plantaciones de banano**

La enfermedad Sigatoka Negra tiene la característica de ser policíclica, debido a la infección de tejidos por medio de las ascosporas y conidios. Esto implica que en una misma hoja de la planta se presentan efectos de ambas estructuras del patógeno (Guzmán 2003), y lo cual combinado con las variantes en las condiciones climáticas tiende a provocar una variación en las agresividades de la enfermedad durante todo el año, de ahí la importancia de los sistemas de monitoreo para la toma de decisiones en cuanto a su combate con el uso de fungicidas. Martínez *et al.*

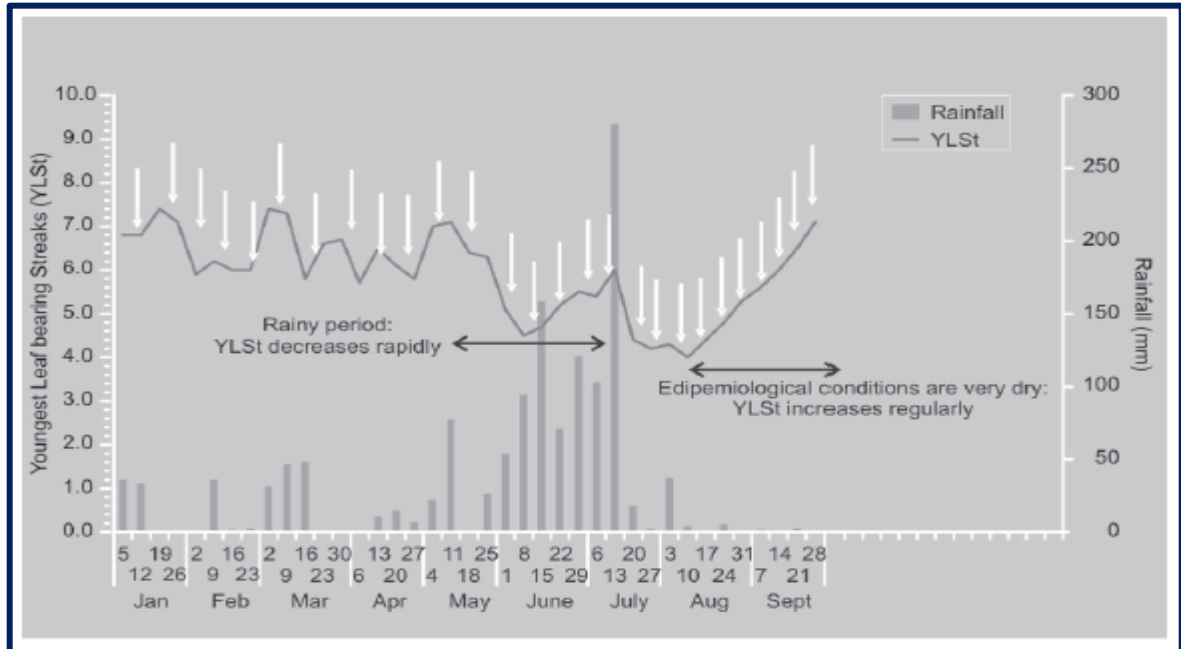
(2011) confirman que la evaluación semanal de Sigatoka Negra en las plantaciones es prioritario para la programación de las aplicaciones de fungicidas.

Se han desarrollado metodologías eficientes para el monitoreo de la Sigatoka Negra en las plantaciones. Estas se dividen en métodos de cuantificación de infección, mediante el conteo de hojas afectadas con los diferentes estadios de la enfermedad, cuantificación del tiempo de la evolución entre estadios o distribución de los diferentes estadios en cada hoja, y por otro lado están los métodos de predicción de infección basados en la integración de variables climáticas, cantidad de inóculo y niveles de infección reales.

La metodología propuesta por Stover modificada por Gauhl (Gauhl y Pasberg 1994) se basa en la determinación de la Severidad de la Enfermedad (SE), evaluando el área foliar necrosada de cada hoja de la planta por medio de una escala de daño o severidad (Anexo 1) y calculando un índice general de las plantas jóvenes infectadas por el patógeno.

También son muy utilizados otros indicadores o parámetros de la enfermedad en las hojas de las plantas como la Hoja más Joven Manchada (HMJM) y la Hoja más Joven con Estrías (HMJE), como se ilustra en la Figura 6; los cuales se basan en la ubicación del daño en la primera hoja totalmente abierta contada de arriba hacia abajo, la misma debe presentar diez o más lesiones de estrías o manchas (ver Figura 5). Según datos reportados en investigaciones estos indicadores presentan variaciones en las evaluaciones semanales de la enfermedad (Figura 7) lo que indica su relación con las condiciones climáticas, y por ende ser utilizados en las aplicaciones estratégicas de fungicidas para el combate de la enfermedad Sigatoka Negra (Freitez 2007, de Lapayre de Bellaire *et al.* 2010, Ganry *et al.* 2012). La principal limitante de los métodos tradicionales ya mencionados para la cuantificación de la enfermedad es basarse en estimaciones visuales de síntomas, generalmente estadios estría 4, manchas o área con quema (necróticas), lo cual significa que un incremento en esas variables no puede utilizarse para implementar cambios en el programa de control, debido a que la mayoría de fungicidas

sistémicos solo tienen capacidad curativa en estados iniciales de estrías. El monitoreo basado en quema, en particular, tiene la limitante que representa el estado final del desarrollo del hongo y la fase de esporulación activa.



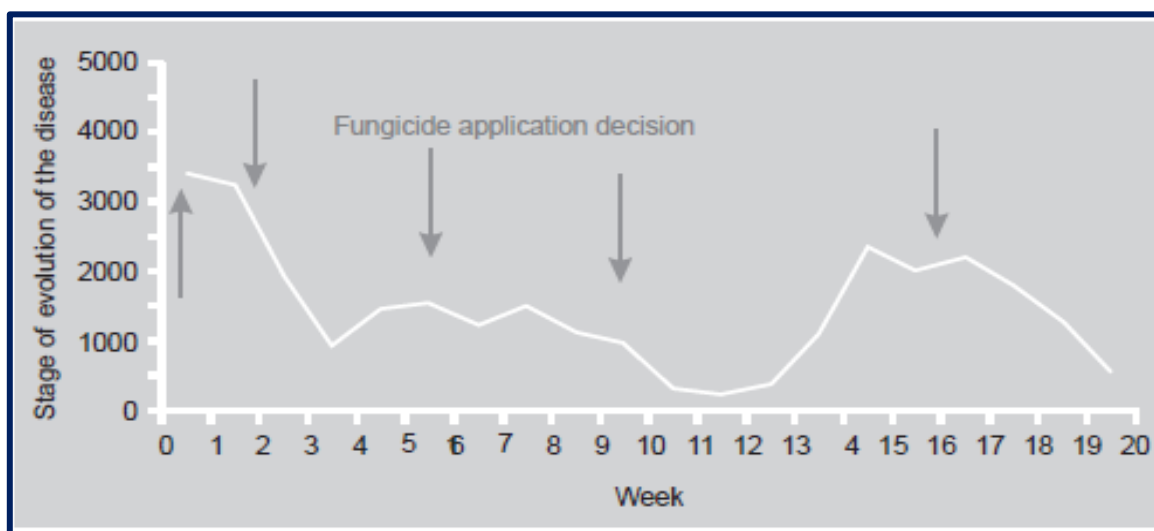
**Figura 6.** Ilustración de las variaciones de la Hoja más Joven con Estrías (HMJE) de acuerdo a las condiciones epidemiológicas y el tiempo de aplicación del tratamiento químico en una plantación de banano. Fuente: de Lapayre de Bellaire *et al.* (2010).

El Preaviso Climático está basado en la alerta de parámetros climáticos como el viento, humedad y temperatura, que permiten un monitoreo de las condiciones climáticas idóneas para el desarrollo de la enfermedad. Considerando en estos parámetros se ejecutan decisiones para obtener un eficiente uso de los fungicidas en las plantaciones, lo cual significa incrementar la eficacia del fungicida y un ahorro en la cantidad de fungicida por hectárea por año (Ganry y Meyer 1972ab).

El método más utilizado es el Sistema de Preaviso Biológico (Ganry y Meyer 1972ab, Ganry y Laville 1983) detallado en el protocolo de Fouré y Ganry (2008) en las Antillas francesas para el monitoreo de la Sigatoka Amarilla. Este método está diseñado para el análisis de variables o descriptores biológicos y climáticos, con el principal objetivo de realizar una oportuna aplicación de fungicidas, donde se

identifica si la severidad de la enfermedad va aumentar si las condiciones climáticas son favorables para el hongo (Guzmán 2003, Ganry *et al.* 2012). En términos prácticos este sistema de preaviso (Fouré y Ganry 2008) se diseñó para el monitoreo semanal de las hojas jóvenes de plantas en áreas de producción comercial, asignando coeficientes arbitrarios a las tres hojas más jóvenes de la planta (II, III y IV), se estima las variables de la Suma Bruta (SB) y el Estado de Evolución (EE). Este método se basa en las evaluaciones de la incidencia y severidad de la enfermedad en la planta, y se implementó a finales de la década de los 80 e inicios de los años 90 y lográndose reducir la cantidad de aplicaciones de fungicidas significativamente (Guzmán 2003, Fouré y Ganry 2008).

Fouré y Ganry (2008), determinaron la aplicabilidad del sistema de preaviso biológico, al monitorear semanalmente el estado de evolución de la enfermedad (EE) y con base en las inflexiones de dicha curva, realizar una estrategia de control en los tiempos o momentos de aplicación de los fungicidas sistémicos y obtuvieron como repuesta un decrecimiento en la agresividad de la enfermedad (Figura 7). Sin embargo, es muy útil solo en condiciones de clima que inhiben germinación por varias semanas o periodos (ventanas secas).



**Figura 7.** Variaciones semanales de la evolución de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano, y tiempo propuesto para la aplicación de fungicidas. Fuente: Fouré y Ganry (2008).

Actualmente los sistemas de monitoreo de la enfermedad ya mencionados son muy utilizados en la industria bananera; sin embargo, Guzmán (2003) menciona que los sistemas perdieron vigencia en la industria por la resistencia a fungicidas por parte de *P. fijiensis*, y por lo tanto los indicadores de monitoreo ya mencionados (SE, HMJM y HMJE) no están siendo utilizados en su totalidad para la toma de decisiones en las plantaciones comerciales. Además, algunos métodos de predicción son difícilmente aplicables a las condiciones de clima y de infecciones normales en la zona del caribe de Costa Rica.

Resulta importante recalcar que actualmente se buscan nuevos enfoques en el monitoreo temprano de la enfermedad, como por ejemplo el uso de tecnologías que contribuyan en la detección y cuantificación temprana del patógeno, debido a la limitante de las evaluaciones que se utilizan hoy en día, de daños ya avanzados en las hojas de las plantas, por lo cual las respuestas son relativamente tardías en el uso de fungicidas y esto conlleva problemas de producción causados por la enfermedad Sigatoka Negra.

#### **1.4.5. Herramientas desarrolladas para la detección y cuantificación molecular del patógeno *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra**

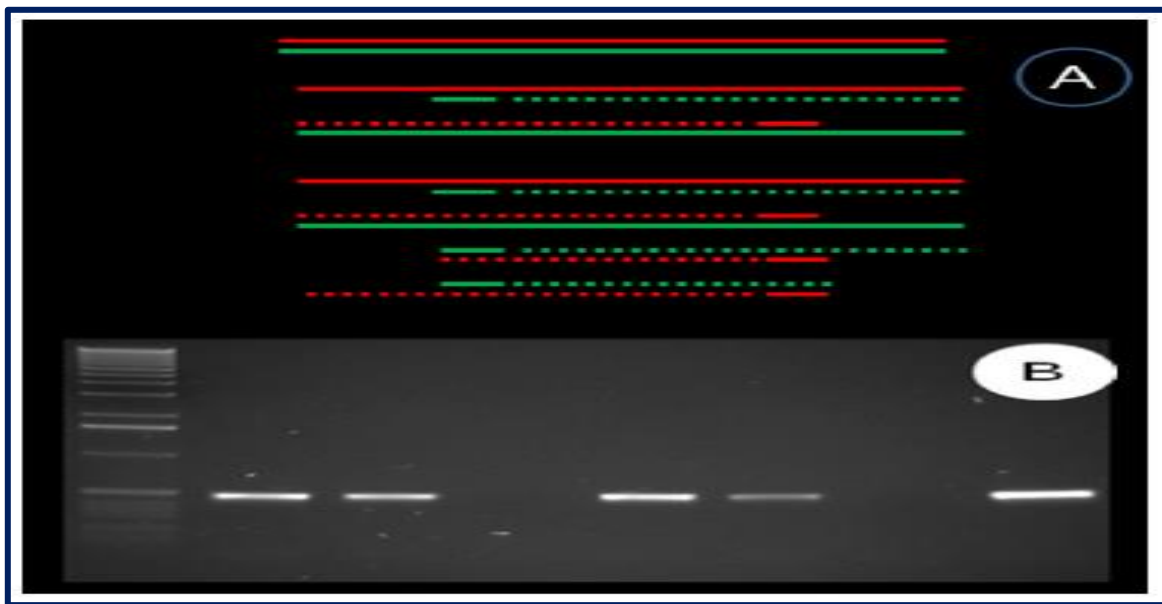
##### **1.4.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

En las últimas décadas, se han desarrollado métodos para el estudio detallado de microorganismos fitopatógenos, utilizando técnicas de serología para la detección de proteínas específicas y la detección de ADN genómico, mitocondrial y ribosomal, así como diferentes tipos de ARN (Johanson y Jeger 1993).

Todos los organismos (micro y macro) contienen la información genética en el ADN (Ácidos Desoxirribonucleicos) de las células, el cual está formado por los nucleótidos de Adenina (A), Citosina (C), Timina (T) y Guanina (G); el ADN es formado por cadenas dobles complementarias entre sí por medio del apareamiento entre los nucleótidos A/T y C/G, este proceso permite realizar copias exactas en la

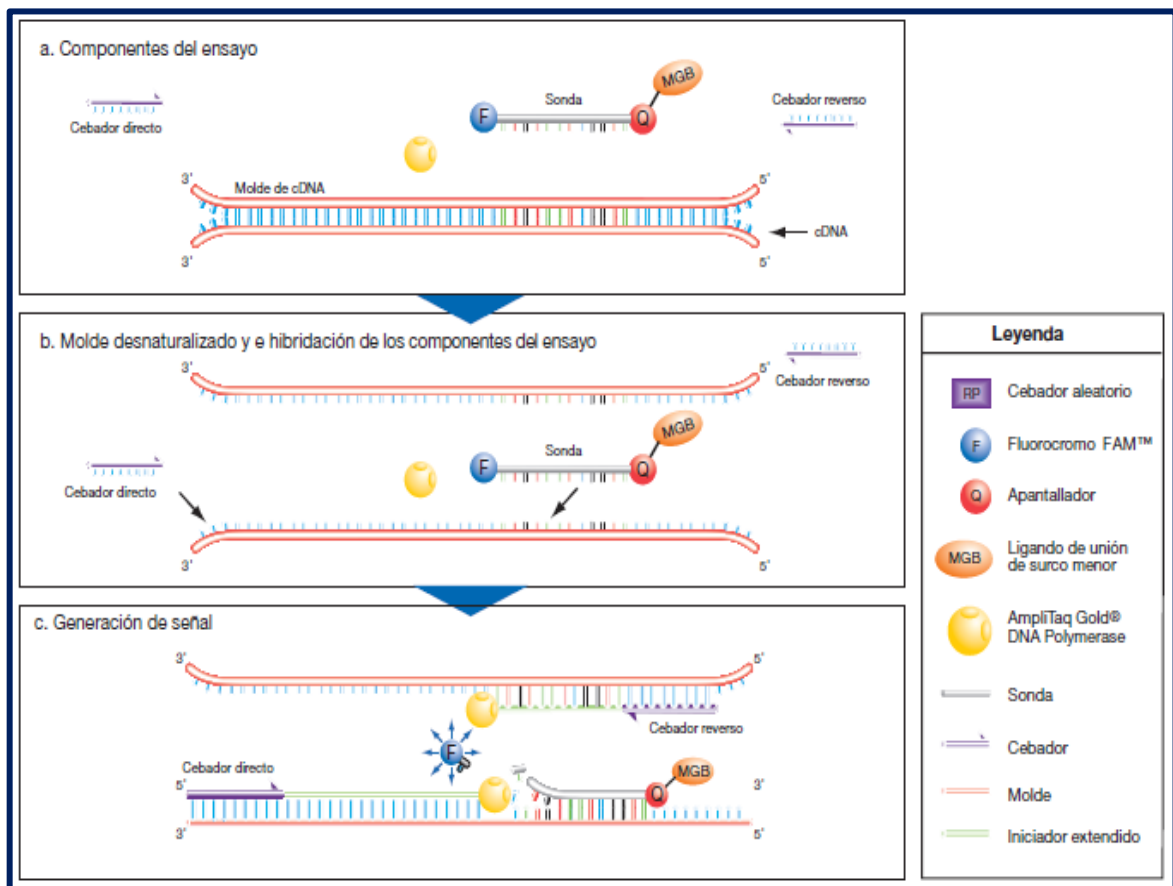


síntesis de la doble cadena y por medio de este proceso la información genética se logra mantener y heredar entre las generaciones (Vásquez *et al.* 2012). Por lo anterior, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) realiza la copia y amplificación de secuencias específicas del ADN bajo el mismo principio (Figura 8A), para ello se requiere del uso de dos fragmentos pequeños de ADN llamados *primers* (cebadores) y mediante la simulación de las condiciones termodinámicas de temperaturas, estos se complementan específicamente en los extremos del fragmento de ADN (gen) que se desea amplificar con la ayuda de una enzima ADN polimerasa (“Taq polimerasa”). Por lo general, las reacciones de PCR se producen por la ubicación de dos *primers* en una secuencia de interés, dicho proceso se da de 30 ciclos a 40 ciclos produciendo billones de copias por cada molécula de ADN original y estos productos se pueden visualizar mediante cromatografía en geles de agarosa con el uso de moléculas fluorescentes (Figura 8B) que se intercalan o se adhieren al producto específico de ADN amplificado (Vázquez-Euán *et al.* 2012).



**Figura 8. (A)** Diagrama modelo de la reacción de PCR. Las líneas continuas representan la doble hebra molde. Las líneas cortas continuas representan los *primers* (cebadores) y la síntesis son las líneas punteadas. **(B)** Visualización de los productos de PCR (bandas de color blanco) y las reacciones negativas (carril sin bandas). Marcador de peso molecular (1 Kb, Invitrogen) en el primer carril. Fuente: Vázquez-Euán *et al.* (2012).

El PCR convencional tiene gran utilidad para la identificación cualitativa de genes específicos de los organismos, o para diferenciar entre organismos de la misma especie, sin embargo, Vázquez-Euán *et al.* (2012) menciona que la principal limitante de la PCR convencional es su carácter no cuantitativo. A raíz de este problema emerge la técnica del PCR en Tiempo Real (Real Time PCR o qPCR) donde se monitorea el avance de la amplificación mientras ocurre la reacción y no al término de esta.



**Figura 9.** Proceso esquemático de la amplificación de ADN por la técnica de PCR en tiempo real, modalidad de Sonda TaqMan®. Fuente: Applied Biosystems (2010).

La modalidad mayormente usada es la que utiliza un tercer fragmento de ADN llamado “Sonda”, diseñado para que se posicione en una región entre los cebadores, la sonda en un extremo lleva una molécula fluorescente y al otro una molécula para mantener opacada la fluorescencia. Al momento de iniciar la

reacción la Taq polimerasa va destruyendo la sonda y sintetizando la nueva hebra amplificada, momento donde el fluoróforo emite la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN sintetizado (Vásquez *et al.* 2012). Qing *et al.* (2005) menciona que esta técnica ha brindado una mayor ventaja en los experimentos por la capacidad de ser cuantitativa, sensible y más específica que la del PCR convencional (Figura 9).

#### **1.4.5.2. Detección y cuantificación molecular de Sigatoka Negra por medio de PCR.**

Al inicio de los años 90 la técnica de PCR se consideró una herramienta robusta frecuentemente utilizada para el diagnóstico, la detección y cuantificación de fitopatógenos causantes de enfermedades con afectaciones importantes en las plantas (Johanson *et al.* 1994). Quirós y Guzmán (2010) mencionan que la detección y cuantificación molecular de microorganismos es posible por la transcripción de genes específicos de sobrevivencia, crecimiento y diferenciación celular, por lo cual es de suma importancia el utilizar estas tecnologías para la detección de enfermedades cuando los síntomas no son visibles.

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios sobre el genoma *P. fijiensis*, y se ha logrado conocer en detalle la diversidad genética y las bases genéticas que explican la diferencia en la patogenicidad de las diferentes especies, así como la detección y cuantificación del patógeno en síntomas tempranos y avanzados de la enfermedad (Buro *et al.* sf, Arzanlou *et al.* 2007, Escobar-Tovar *et al.* 2015).

Los estudios desarrollados por Johanson y Jeger (1993) fueron la base del diagnóstico de la enfermedad Sigatoka Negra en banano por medio de la técnica del PCR, diseñando *primers* específicos asociados con regiones conservadas del ADN ribosomal de los patógenos (ITS). Este trabajo permitió diferenciar a nivel molecular entre las enfermedades de la Sigatoka Negra (*P. fijiensis*) y Sigatoka Amarilla (*M. musicola*), las cuales presentan síntomas con características algo diferentes y que visualmente no son muy claras. Este sistema dio paso a

numerosas investigaciones para detectar la enfermedad en las plantaciones de banano, principalmente en tejido foliar naturalmente infectado (Johanson *et al.* 1994, Johanson 1997, Romero *et al.* sf, Quirós y Guzmán 2008, Vázquez-Euán *et al.* 2012, Escobar-Tovar *et al.* 2015).

Sumado a lo anterior, se han desarrollado estudios usando las técnicas PCR convencional y PCR Tiempo Real en el análisis de polimorfismos por RFLP, microsatélites, y multiplex, los cuales han demostrado en términos de diversidad genética las diferencias existentes entre especies del mismo género, las diferencias que presentan estas poblaciones de Sigatoka Negra en cuanto a su patogenicidad en distintos países y en las localidades donde se cultiva banano, lo cual abre campo al entendimiento de la dinámica de la enfermedad y las condiciones climáticas en las que se desarrolla (Carlier *et al.* 1994, Neu *et al.* 1999, Muller *et al.* 2000, Molina *et al.* 2001, Conde-Ferráez *et al.* 2007, Arzanlou *et al.* 2008, Arzanlou *et al.* 2009, Fahleson *et al.* 2009, Quirón y Guzmán 2009a, Conde-Ferráez *et al.* 2010, Manzo-Sánchez *et al.* 2012, Saville *et al.* 2017). Estos estudios han evidenciado que el método es altamente sensible, específico, reproducible y confiable para la detección-cuantificación molecular del agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra (*P. fijiensis*). Con otras técnicas moleculares, Molina *et al.* (2001) desarrollaron protocolos para detectar las primeras etapas de infección de Sigatoka en hojas jóvenes, con pruebas de enzimas conjugadas inmunoabsorbentes (ELISA).

Una de las desventajas que presenta la PCR convencional es permitir solo la identificación cualitativa en los ensayos, donde principalmente se requieren resultados cuantitativos, los que son posibles obtener con la técnica del PCR Tiempo Real. Sin embargo, estimar la cantidad de ADN de un patógeno proveniente de cultivos puros (cultivos monospóricos) por medio de la técnica no es tan complejo como cuantificar el ADN del patógeno presente en una muestra foliar naturalmente infectada, para ello se requieren de protocolos muy estandarizados, robustos y eficientes para la extracción de ADN genómico de plantas y hongos filamentosos (Edwards *et al.* 1991, Islas-Flores *et al.* 2006, Quirós 2005, Quirós *et al.* 2008). Para

determinar la cantidad de ADN de un patógeno en una muestra naturalmente infectada se utilizan actualmente las Curvas Estándares, con el propósito de determinar la cantidad absoluta de un gen en una muestra y mediante la construcción de la curva estándar a partir de una dilución seriada (ejemplo, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) de una cantidad de ADN conocida (Applied Biosystems 2010).

Arzanlou y colaboradores (2007) lograron estandarizar la metodología base para el desarrollo del monitoreo molecular de la Sigatoka Negra, con *primers* y sondas diseñados para la detección específica del gen de la  $\beta$ -tubulina. Establecieron regresiones de curvas estándares ( $R^2=0,99$ ) entre los ciclos de umbral ( $C_t$ ) y cantidades conocidas del patógeno ( $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  y  $10^4$ ), con una eficiencia del PCR del 88,34 %. Por lo tanto, la técnica logró estimar con alta precisión la cantidad de ADN presente tanto en hojas inoculadas y naturalmente infectadas, logrando cuantificar el patógeno en hojas con síntomas avanzados y hojas con síntomas tempranos de la enfermedad.

En los últimos años en Costa Rica Corporación Bananera Nacional (CORBANA) logró estandarizar sus protocolos de extracción del material genómico para la detección y cuantificación de *P. fijiensis* mediante la metodología de curvas estándares para el complejo de Sigatoka Negra (Arzanlou *et al.* 2007), obteniendo resultados importantes y promisorios para el desarrollo del monitoreo molecular al servicio de los productores bananeros (Quirós y Guzmán 2008, Quirós *et al.* 2008, Quirós y Guzmán 2009bc, Quirós y Guzmán 2010). Por otro lado, la Universidad Estatal de Carolina del Norte, en su investigación adaptaron la técnica molecular LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) para la identificación temprana y específica de *Pseudocercospora fijiensis* con el diseño de 4-6 *primers* para la exitosa amplificación de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer), esta técnica con respecto al PCR se diferencia por ser rápida y económica en el análisis, por no requerir equipos sofisticados de laboratorio (Saville y Ristaino 2018).

#### **1.4.6. Modelos predictivos desarrollados para explicar la dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano**

En los años 80's y 90's los sistemas de preaviso biológico (Ganry y Meyer 1972ab, Ganry y Laville 1983) perdieron vigencia en las plantaciones de banano para la predicción del estado de evolución de la enfermedad (EE), como consecuencia de la resistencia desarrollada por el patógeno a los fungicidas más activos (benzimidazoles, triazoles y estrobirulinas) y limitando su actividad posinfección en el control (Romero 1996, Guzmán 2003). En el transcurso de esas décadas se desarrollaron estudios epidemiológicos de la Sigatoka Negra, en búsqueda de la predicción por medio de modelos o algoritmos matemáticos que integran variables biológicas del patógeno y factores climáticos, con el objetivo de hacer un eficiente y oportuno uso de los fungicidas.

Contreras-Medina *et al.* (2009) mencionan que es necesario el entendimiento de los factores que determinan a las enfermedades, para obtener una sostenibilidad en las prácticas estratégicas y un manejo táctico de las enfermedades, en búsqueda de la reducción en los impactos ambientales. Para ello, las matemáticas, la estadística y otras herramientas son utilizadas en el entendimiento de los factores que definen o modelan las dinámicas de enfermedades en plantas, la cual ha venido ganando popularidad en los sistemas, debido al desarrollo de una predicción óptima y eficientes mecanismos de control (Contreras-Medina *et al.* 2009).

Los factores climáticos y el estado nutricional de la planta son algunos de los factores que influyen en la evolución de la enfermedad. Hernández *et al.* (2005) y otros autores (Gauhl 1989, Gauhl y Pasberg 1994) señalan que la incidencia y la severidad de la enfermedad está altamente correlacionada con el clima. Por lo anterior, Aguirre *et al.* (2012) señalan que la dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra es estacional, donde las afectaciones más fuertes ocurren durante la época lluviosa y en menor grado en épocas donde las condiciones son secas y frías. En el Cuadro 1 se recopila información sobre modelos de predicción de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano y plátano.

**Cuadro 1.** Recopilación de modelos predictivos de la infección de Sigatoka Negra (*P. fijiensis*) y Sigatoka Amarilla (*M. musicola*) en plantas de banano y plátano, en diferentes regiones del mundo (1980 - 2018).

Referencia	País	Enfermedad	Variable de Predicción	Modelos (Ecuación)	R <sup>2</sup>
Chuang y Jeger (1985)	Taiwán	Sigatoka Negra	Tasa de Progreso de la Enfermedad (y)	$y = 0,124 (Z_1) + 0,0000426 (A_1) + 0,0000515 (I_{16})$	0,83
Porras y Pérez (1993)	Cuba	Sigatoka amarilla	Suma de Velocidades de Evolución (SV)	$SV = 48,14 (T_{\text{mín}}) - 38,4 (T_{\text{máx}}) + 2074,45$	0,99
		Sigatoka Negra		$SV = 7,18 (T_{\text{máx}}) - 79,16 (T_{\text{mín}})$	0,99
		Constante de Velocidad de Crecimiento (Vf)	$Vf = 79,35e^{-0,015} (x - 27,32)^2$	0,91	
Romero y Sutton (1995ab)	Costa Rica	Sigatoka Negra	Período de Incubación (PI)	-	0,70
			Período de Latencia (PL)	-	0,80
Burt <i>et al.</i> (1999)	Costa Rica	Sigatoka Negra	Número de Peritecios (y)	$\ln(y) = 0,975 (\ln(\text{área necrótica})) + 6,685$	0,88
				$\ln(y) = 1,173 (\ln(\text{área necrótica})) + 4,624$	0,99
			Número de Ascosporas (y)	$\ln(y) = 1,173 (\ln(\text{área necrótica})) + 6,128$	0,99
Hernández <i>et al.</i> (2005)	Venezuela	Sigatoka Negra	Promedio Ponderado de Infección (PPI)	$PPI = 3,7241 - 0,0047 (Nub) - 0,0017 (T_{\text{mín}}) + 2,0190 (HR) - 0,0051 (Eva)$	0,33
Freitez (2007), Freitez <i>et al.</i> (2009)	Venezuela	Sigatoka Negra	Hoja más Joven Manchada (HMJM)	$HMJM = 0,2308 (ES) - 0,0883 (HR) + 13,724$	0,70
			Severidad de la Enfermedad (SE); época lluviosa	$SE = 0,5825 (Tp) - 75,5733 (ET) + 0,1867 (HR) + 0,2671 (PA) + 0,525 (PA) - 0,2757$	0,72
			Severidad de la Enfermedad (SE); época seca	$SE = 0,4096 (HR) + 0,7443 (Ppro) + 0,0654 (RS) + 0,4655 (Vv) - 41,193$	0,79
Hernández <i>et al.</i> (2009)	Venezuela	Sigatoka Negra	Promedio Ponderado de Infección (PPI)	$PPI = -12,6233 + 0,05382 (Nubos) + 0,01179 (Insol)$	0,71
Gómez (2017)	Colombia	Sigatoka Negra	Estado de Evolución de la Enfermedad (EE)	$EE = 25447,3 - 188,4 (Tp) - 120,5 (HR_{\text{mín}}) - 149,6 (HRp) + 42,8 (HR_{\text{máx}}) + 53,2 (BSp)$	0,95

Los modelos de predicción temprana han sido utilizados desde los años 80 para el entendimiento de la dinámica del patosistema Sigatoka Negra - *Musa* AAA; y han tenido un uso limitado a nivel comercial. Los modelos recopilados de la literatura están desarrollados para la predicción de variables como el promedio ponderado de infección, severidad de la enfermedad, velocidad de evolución, estado de evolución de la enfermedad, hoja más joven manchada, que por lo general son utilizadas en la industria bananera para el pronóstico de la enfermedad, integrando las variables de temperaturas, nubosidad, precipitación, humedad relativa, humedad foliar, radiación solar y evaporación. Gómez (2017) detalla que las condiciones climáticas como la humedad relativa, la temperatura y la precipitación tienen una relación muy directa con el patógeno, el cual presenta patrones distintos de incidencia y severidad según sea la época lluviosa o la seca.

La importancia de predecir de forma temprana la dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra en las plantaciones es contribuir en la utilización estratégica de fungicidas, con el fin de aumentar la eficiencia sobre el patógeno en crecimiento en hojas jóvenes y reducir los costos de control (Ortiz *et al.* 2002). Sin embargo, estos modelos pueden tener desviaciones muy altas en la predicción de la enfermedad si se utilizan bajo otras condiciones climáticas, de aquellas para los que fueron desarrollados.

Resulta importante recalcar que en su mayoría los modelos ya desarrollados no incluyen la variable de inóculo ambiental o efectivo en la superficie de la hoja, y dado que el mismo está influenciado por los eventos de condiciones climáticas, podría considerarse como una variable significativa en los modelos de predicción temprana. Por lo tanto, lo ideal para todo el campo de investigación es tener una estimación del inóculo presente en el sistema, la cantidad de infección en el primer estadio y relacionarlo con las condiciones de clima favorables para el patógeno *P. fijiensis*. Esto permitiría definir la masa de inóculo efectivo en términos de infección. Posteriormente, una vez que ocurre la infección temprana, se puede utilizar esa información y las condiciones de clima para generar modelos de predicción con un horizonte de al menos seis semanas.



## 1.5. CONCLUSIONES

Con base en la revisión de literatura, se concluye que:

La enfermedad de la Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*) está ampliamente distribuida en la mayoría de países donde se produce banano (*Musa AAA*). La incidencia y severidad de la enfermedad está directamente relacionada con las condiciones climáticas propicias para su dinámica en las plantaciones comerciales.

El combate de la enfermedad actualmente se realiza principalmente por medio del uso de fungicidas protectantes, sistémicos y translaminares, y en menor medida con el manejo nutricional y cultural de la plantación.

Los sistemas de preaviso biológico e indicadores de incidencia y severidad de la Sigatoka Negra, más el monitoreo de las condiciones climáticas, son herramientas aún utilizadas en las plantaciones para determinar el avance de la enfermedad y las estrategias de usos de fungicidas apuntan en hacer su uso racional y eficiente en el combate en las condiciones de las plantaciones comerciales.

Los avances en el uso de técnicas de biología molecular para la detección y cuantificación del ADN del patógeno (*P. fijiensis*) como variable de inóculo presente en las plantas de banano, ha sido constante desde los años 90 a la fecha y ha demostrado ser una metodología precisa, robusta, sensible y reproducible a escala comercial en la industria bananera.

Se han desarrollado modelos de predicción temprana de la enfermedad Sigatoka Negra para las variables biológicas de mayor uso en la industria bananera, con alto potencial para explicar la dinámica de la agresividad de la enfermedad mediante la utilización de factores climáticos de temperaturas, precipitación, humedad relativa y radiación solar. Sin embargo, se desconoce a nivel de literatura el uso comercial de los modelos predictivos de la enfermedad Sigatoka Negra en la industria bananera.

## 1.6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. 5th ed. LIMUSA. Florida, USA. 1936 p.
- Aguirre, SE; Piraneque, NV; Menjivar, JC. 2012. Relación entre las propiedades edafoclimáticas y la incidencia de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en la zona bananera del Magdalena-Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental 3(2):13-23.
- Alarcón, J; Jiménez, Y. 2012. Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (*Musa* spp): Medidas para la temporada invernal (en línea). ICA (Instituto Colombiana Agropecuario). Bogotá, COL. Consultado 28 abr. 2017. Disponible en <http://www.ica.gov.co/getattachment/08fbb48d-a985-4f96-9889-0e66a461aa8b/-nbsp;Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-platano.aspx>
- Álvarez, E; Pantoja, A; Gañan, L; Ceballos, G. 2013. Estado del arte y opciones de manejo del Moko y la Sigatoka Negra en América Latina y el Caribe. Cali, Colombia, CIAT, FAO. 40 p.
- Applied Biosystems. 2010. Guía de Introducción Step One™: Sistema PCR Tiempo Real - Experimentos de Curva Estándar. California, USA. 169p.
- Arias, P; Dankers, C; Liu, P; Pilkauskas P. 2004. La economía mundial del banano 1985-2002. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). Viale delle Terme di Caracalla. Roma, IT. 98 p.
- Arzanlou, M; Abeln, ECA; Kema, GHJ; Waalwijk, C; Carlier, J; De Vries, I; Guzmán, M; Crous, PW. 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology* 97(9):1112-1118.
- Arzanlou, M; Groenewald, JZ; Fullerton, RA; Abeln, ECA; Carlier, J; Zapater, MF; Buddenhagen, IW; Viljoen, A; Crous, PW. 2008. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia* 20:19-37.

- Arzanlou, M; Crous, PW; Zwiars, LH. 2009. Evolutionary dynamics of mating-type loci of *Mycosphaerella* spp. Occurring on banana. *Eukaryotyc Cell* 9(1):164-172.
- Bach, O. 2007. Informe Final: Agricultura e implicaciones ambientales con énfasis en algunas cuencas hidrográficas principales. Décimo tercer informe del Estado de la Nación en Desarrollo Humano Sostenible. San José, CR, CONARE y Defensoría de los Habitantes. 22 p.
- Burt, PJA; Rosenberg, LJ; Rutter, J; Ramirez, F; Gonzalez, H. 1999. Forecasting the airborne spread of *Mycosphaerella fijiensis*, a cause of black Sigatoka on banana: estimations of numbers of perithecia and ascospores. *Ann. Appl. Biol* 135:369-377.
- Buro, R; Zúñiga, C; Madriz, J. sf. Extracción de ADN de *Mycosphaerella fijiensis* proveniente de diferentes aislamientos colectados en Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 17(1):72-82.
- Cayón, G; Lozada, J; Belalcázar, S. 1991. Estudios comparativos sobre la actividad fotosintética de clones de plátano (*Musa* AAB y ABB, Simmonds) en Colombia. Pag. 549-558. *In* Memorias Reunión Acorbat 91, Villahermosa (México). CORBANA, San José (Costa Rica).
- Carlier, J; Mourichon, X; González de León, D; Zapater, MF; Lebrun, MH. 1994. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot disease. *Phytopathology* 84: 751-756.
- Conde-Ferráez, L; Waalwijk, C; Canto-Canché, BB; Kema, GHJ; Crous, PW; James, AC; Abeln, ECA. 2007. Isolation and characterization of the mating type locus of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of the black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology* 8(1):111-120.
- Contreras-Medina, LM; Torres-Pacheco, I; Guevara-González, RG; Romero-Troncoso, RJ; Terol-Villalobos, IR; Osornio-Ríos, RA. 2009. Mathematical modeling tendencies in plant pathology. *African Journal of Biotechnology* 8(25):7399-7408.

- Conde-Ferrández, L; Grijalva-Arango, R; Canto-Canché, B; Manzo-Sánchez, G; Canul-Salazar, M; James, AC. 2010. The development of mating type-specific primers for *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka of banana, and analysis of the frequency of idiomorph types in Mexican populations. *Australian Plant Pathology* 39:217-225.
- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). 2011. Implementación de buenas prácticas agrícolas para reducir el escurrimiento de plaguicidas en el cultivo de banano de la región Caribe Costarricense (en línea). Consultado 13 mar. 2018. Disponible en <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-corbana/Estudio%20de%20caso%20Corbana.pdf>
- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). 2018. Fomento y desarrollo de la industria bananera en Costa Rica: Estadísticas bananeras (en línea). San José, CR. Consultado 26 oct. 2018. Disponible en <https://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananeras>
- Chuang, TY; Jeger, MJ. 1987. Predicting the rate of development of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*) disease in southern Taiwan. *Phytopathology* 77:1542-1547.
- Churchill, ACL. 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 12(4):307-328.
- Crous, PW; Schoch, CL; Hyde, KD; Wood, AR; Gueidan, C; de Hoog, GS; Groenewald, JZ. 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Stud. Mycol* 64:17-47.
- de Lapayre de Bellaire, L; Fouré, E; Abadie, C; Carlier, J. 2010. Black leaf streak disease is challenging the banana industry. *Fruits* 65(6):327-342.

- Edwards, K; Johnstone, C; Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19(6):1349.
- Escobar-Tovar, L; Magaña-Ortíz, D; Fernández, F; Guzmán-Quesada, M; Sandoval-Fernández, JA; Ortiz-Vázquez, E; Loske, AM; Gómez-Lim, MA. 2015. Efficient transformation of *Mycosphaerella fijiensis* by underwater shock waves. *Journal of Microbiological Methods* 119:98-105.
- Fahleson, J; Nakyanzi, M; Okori, P; Seal, S; Kenyon, L; Dixelius, C. 2009. Genetic analysis *Mycosphaerella fijiensis* in the Ugandan Lake Victoria region. *Plant Pathology* 58:888-897.
- Firman, ID. 1972. Black leaf streak of bananas in Fiji. *Ann. Appl. Biol* 70:19-24.
- Fouré, E. 1985. Black leaf streak Disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet), Study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFE, Paris.
- Fouré, E; Ganry, J. 2008. A biological forecasting system to control Black Leaf Streak disease of bananas and plantains *Fruits* 63:311-317.
- Freitez, JA. 2007. Desarrollo de un modelo predictivo del brote de la Sigatoka Negra para las plantaciones de plátano al sur del lago de Maracaibo. Tesis MSc. Mérida, Venezuela, Universidad de los Andes. 124 p.
- Freitez, JA; Ablan, M; Gómez, C. 2009. Propuesta de modelos predictivos del brote de la Sigatoka Negra para las plantaciones de plátano al sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. *UDO Agrícola* 9(1):191-198.
- Ganry, J; Meyer, JP. 1972a. La lutte contrôlée contre le *cercospora* aux Antilles. 1- Bases climatiques de l'avertissement. *Fruits* 27:665-676.
- \_\_\_\_\_. 1972b. La lutte contrôlée contre le *Cercospora* aux Antilles. Technique d'observation et de numérotation de la maladie. *Fruits* 27:767-774.

- Gauhl, F. 1989. Epidemiología y ecología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (*Musa* sp.) en Costa Rica. Unión de Países Exportadores de Banano (Upeb), Ciudad de Panamá (Panamá). 114 p.
- Gauhl, F; Pasberg-Gauhl, C. 1994. Epidemiology of Black Sigatoka disease on plantain in Nigeria. *Phytopathology* 84 (10):1080.
- Ganry, J; Fouré, E; de Lapayre de Bellaire, L; Lescot, T. 2012. An Integrated Approach to Control the Black Leaf Streak Disease (BLSD) of Bananas, while reducing fungicide use and environmental impact (en línea). Consultado 18 oct. 2018. Disponible en [http://cdn.intechopen.com/pdfs/26030/InTech-An\\_integrated\\_approach\\_to\\_control\\_the\\_black\\_leaf\\_streak\\_disease\\_blsd\\_of\\_bananas\\_while\\_reducing\\_fungicide\\_use\\_and\\_environmental\\_impact](http://cdn.intechopen.com/pdfs/26030/InTech-An_integrated_approach_to_control_the_black_leaf_streak_disease_blsd_of_bananas_while_reducing_fungicide_use_and_environmental_impact).
- Gowen, S. 1995. Bananas and plantains. 1er Ed, UK. Chapman & Hall. 634 p.
- Gómez Ruíz, ML. 2013. Efecto de las condiciones de incubación y de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Tesis Lic. San Carlos, CR, TEC. 99 p.
- Gómez Correa, JC. 2017. Desarrollo de modelos predictivos de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet) en banano para la región de Urabá, Antioquia - Colombia. Tesis MSc. Medellín, Colombia. UNC. 116 p.
- Gómez-Correa, JC. Torres-Aponte, WS; Cayón-Salinas, DG; Hoyos-Carvajal, LM; Castañeda-Sánchez, DA. 2017. Modelación espacial de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet) en banano cv. Gran Enano. *Revista Ceres, Vicos* 64(1):047-054.
- Guzmán, M. 2003. Epidemiología de la Sigatoka Negra y el sistema de preaviso biológico. Pag. 26-27. *In* Taller INIBAP, Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Guayaquil. ECU.
- Hernández, L; Hidalgo, W; Linares, B; Hernández, J; Romero, N; Fernández, S. 2005. Estudio preliminar de vigilancia y pronóstico para Sigatoka Negra

(*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el cultivo de plátano (*Musa* AAB cv Hartón) en Macagua-Jurimiquire, estado Yaracuy. Revista Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia 22(4):325-339.

Henderson, J; Pattemore, JA; Porchum, SC; Hayden, HL; Van Brunschot, S; Grice, KRE; Peterson, RA; Thomas-Hall, S.R; Aitken, EAB. 2006. Black Sigatoka disease: new technologies to strengthen eradication strategies in Australia. Australasian Plant Pathology 35:181-193.

Hernández, J; Sanabria, N; Blanco, G; Linares, B; Milla, M; Pérez, A. 2009. Predicción de Sigatoka Negra en "Plátano Hartón" bajo condiciones de fertilización del suelo en el municipio Veroes del estado Yaracuy, Venezuela. Agronomía Tropical 59(3):317-322.

Islas-Flores, I; Peraza-Echeverría, L; Canto-Canché, B; Rodríguez-García, CM. 2006. Extraction of high-quality, melanin-free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA preparation. Molecular Biotechnology 34:45-50.

Johanson, A; Jeger, MJ. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of *sigatoka* leaf spots in banana and plantain. Mycol. Res 97:670-674.

Johanson, A; Crowhurst, RN; Rikkerink, EHA; Fullerton, RA; Templeton, MD. 1994. The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. Plant Pathology 43:701-707.

Johanson A. 1997. Detection of Sigatoka Leaf Spot Pathogens of Banana by the Polymerase Chain Reaction. Natural Resources Institute, Chatham, UK.

Liberato, J; Peterson, R; Gasparotto, L; Ferrari, J; Grice, K; Porchun, S; Shivas, R. 2009. Black Sigatoka of banana (*Mycosphaerella fijiensis*) (en línea). Consultado 04 oct. 2018. Disponible en <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=35278>

- Lazo, JV; Muñoz, JA; Escalona, A. 2012. Evaluación experimental del clorotalonil en el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plantaciones de plátano (*Musa* spp. AAB). *Bioagro* 24(2):127-134.
- Marín, DH; Romero, RA; Guzmán, M; Sutton, TB. 2003. Black Sigatoka: An increasing treat to banana cultivation. *Plant disease* 87 (3):208-222.
- Manzo-Sánchez, S; Guzmán-González, S; Rodríguez-García, CM, James, A; Orozco-Santos, M. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1):87-96.
- Martínez, I; Villalta, R; Soto, E; Murillo, G; Guzmán, M. 2011. Manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo de banano (en línea). *Hoja divulgativa* 2011 (2):1-2. Consultado 14 mar. 2017. Disponible en <http://www.infoagro.net/programas/Ambiente/pages/adaptacion/casos/Sigatoka.pdf>
- Manzo-Sánchez, G; Orozco, M; Islas, I; Martínez, L; Guzmán, S. 2012. Conociendo la diversidad genética de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) para lograr un manejo integrado. Pag. 21-31. *In* Innovaciones para el manejo integrado en campo de la Sigatoka Negra en México. Aportaciones a la investigación básica. Yucatán, México.
- Meredith, DS; Lawrence, JS. 1969. Black leaf streak of banana (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society* 52(3):459-476.
- Mourichon, X; Carlier, J; Fouré, E. 1997. Enfermedades de Sigatoka: Raya negra de la hoja (Sigatoka Negra) Enfermedad de Sigatoka (Sigatoka amarilla) (en línea). *Hoja divulgativa* N°8, PROMUSA. Consultado 26 oct. 2018. Disponible en [http://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx\\_news/Sigatoka\\_leaf\\_spot\\_diseases\\_699\\_ES.pdf](http://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx_news/Sigatoka_leaf_spot_diseases_699_ES.pdf)



- Mourichon, X; Zapater, M. 1990. Obtention in vitro du stade *Mycosphaerella fijiensis* forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. *Fruits* 45:553-557.
- Molina, C; Kaemmer, D; Aponte, S; Weising, K; Kahl, G. 2001. Microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella musicola*. *Molecular Ecology Notes* 1. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00051.x>
- Müller, R; Pasberg-Gauhl, C; Gauhl, F; Kaemmer; Kahl, G. 2000. *INFOMUSA* 4(1):9-10.
- Neu, C; Kaemmer, D; Kahl, G; Fischer, D; Weising, K. 1999. Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 8: 523-525.
- Nelson, S. 2008. Black leaf streak of Banana. *Plant Disease* PD-50:1-10.
- Ortiz, R; Vuylsteke, D. 1996. Recent advances in *Musa* genetics, breeding and biotechnology. *Plant Breeding Abstracts*. 66 (10):1334-1363.
- Ortiz, JL. 2001. Desarrollo de una metodología para la transformación genética de banano (cv Gran Enano) y plátano (cv Curraré) de consumo local para introducir resistencia a la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Tesis M. Sc., Turrialba, CR, CATIE. 71 p.
- Ortiz, JL; Gómez, M; Vázquez, N; Aguilar, ME. 2002. Transformación genética de banano (cv Gran Enano) y plátano (cv Curraré) para introducir resistencia a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) (en línea). Pag. 49-53. *In: Acorbat. Memorias XV reunión (Cartagena, Colombia)*. Medellín, COL. Acorbat. Consultado 15 mar. 2018.
- Orozco-Santos, M; Orozco-Romero, J; Pérez-Zamora, O; Manzo-Sánchez, G; Farías-Larios, J; da Silva Moraes, W. 2008. Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka Negra en banano y plátano. *Rev. Tropical Plant Pathology* 33(3):189-196.

- Orozco, M; García, K; Manzo, G; Guzmán, S; Martínez, L; Beltrán, M; Garrigo, E; Torres, J; Canto, B. 2013. La Sigatoka Negra y su manejo integrado en banano. Libro técnico No 1. SAGARPA, INIFAB, CIRPAC, México. 152 p.
- Parnell, M; Burt, PJA; Wilson; K. 1998. The influence of exposure to ultraviolet radiation in simulated sunlight on ascospores causing black Sigatoka disease of banana and plantain. *Int. J. Biometeorol* 42(1):22-27.
- Patiño, L; Bustamante, E; Salazar, L. 2006. Efecto de sustratos foliares sobre la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa × paradisiaca* L.) y plátano (*Musa acuminata* Colla). *Agricultura Técnica* 67(4): 437-445.
- Pérez-Vicente, L; Mauri-Mollera, F; Hernández-Mancilla, A; Abreu-Antúnez, E; Porras-González, A. 2000. Epidemiología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba. I Pronóstico bioclimático de los tratamientos de fungicidas en bananos (*Musa acuminata* AAA). *Revista Mexicana de Fitopatología* 18 (1):15-26.
- Pérez-Vicente, L. 2009. Enfermedades de banano y plátano: Análisis retrospectivo y perspectivas. *Producción Agropecuaria* 2(1):11-18.
- Porras, A; Pérez, L. 1993. Método para el cálculo de las sumas de velocidades de desarrollo para el pronóstico bioclimático de los tratamientos contra Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y amarilla (*M. musicola* Leach ex Mulder) a partir de la temperatura máxima y mínima diaria. *In*. VII Fórum de Ciencia y Técnica. La Habana, Cuba.
- Ploetz, R. 2001. Black Sigatoka of banana: The most important disease of most important fruit. *APS Journals*. DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0126-02.
- Qing, YZ; Westermarck, SO; Lestander, AR; Wang, XR. 2006. Detection and quantification of *Cladosporium* in aerosols by real time PCR.
- Queiroz, C; Ferreira, M; Ferreira, G; Gomide, E; Fernandes, E; Vieira, M. 2013. Use of the IRAP to study genetic variability in *Pseudocercospora fijiensis* populations. *Current Microbiology*. DOI 10.1007/s00284-013-0454-y.

- Quirós, O. 2005. Extracción de ADN de banano para su utilización en estudios de biología molecular. Pag.128-129. *In* Informe anual 2005. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Quirós, O; Guzmán, M. 2008. Establecimiento de una metodología para la identificación de *Mycosphaerella fijiensis* y *Mycosphaerella musicola* y para la extracción de ADN de ambos patógenos de tejido foliar infectado. Pag.183-185. *In* Informe anual 2007. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Quirós, O; Aguilar, X; Guzmán, M. 2008. Optimización de un método de cultivo in vitro de *Mycosphaerella fijiensis* para la extracción de su ADN genómico en estudios moleculares. Pag.186-190. *In* Informe anual 2007. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Quirós, O; Guzmán, M. 2009a. Estimación de la diversidad genética de *Mycosphaerella fijiensis* con marcadores microsatélites, en fincas de banano con historial de baja, media y alta presión de la Sigatoka Negra. Pag.260-266. *In* Informe anual 2008. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- \_\_\_\_\_.2009b. Ajuste y estandarización del PCR en Tiempo Real (RT-PCR) para la detección y cuantificación de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra en banano. Pag.267-268. *In* Informe anual 2008. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- \_\_\_\_\_.2009c. Comparación de dos protocolos de extracción de ADN para ser utilizados en el análisis de PCR en tiempo real (RT-PCR) para la detección y cuantificación de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra en banano. Pag.269-275. *In* Informe anual 2008. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.

- Quirós, O; Guzmán, M. 2010. Cuantificación de ADN de *Mycosphaerella fijiensis* en ascosporas y en hojas de banano asintomáticas, mediante PCR en tiempo real: bases para el desarrollo del monitoreo molecular. Pag.189-195. *In* Informe anual 2009. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Rotem, J; Wooding, B; Aylor, DE. 1985. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. *Phytopathology* 75(5):510-514.
- Rotem, J; Aust, H. 1991. The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagates. *Journal of Phytopathology* 133:76-84.
- Robinson, JC. 1996. Bananas and plantain. Institute for Tropical and Subtropical Crops, private bag x 11208, Nelspruit 1200. South Africa. 283 p.
- Romero, RA; Sutton TB. 1995a. Dynamics of fungicide-resistant populations of *Mycosphaerella fijiensis* and epidemiology of black Sigatoka of bananas. PhD thesis. Department of Plant Pathology, NCSU, Raleigh. 113 p.
- \_\_\_\_\_. 1995b. Modelos para predecir la duración del período de incubación y latencia de la Sigatoka Negra del banano. Pag. 50-52. *In* Informe anual 1995. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Romero, RA. 1996. Avances en epidemiología y manejo de la Sigatoka Negra del banano. *In* X Congreso Nacional Agronómico/III Congreso de Fitopatología. Dirección de Investigaciones Agrícolas CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Robinson, JC; De Villiers, EA. 2007. The cultivation of banana. ARC-Institute for Tropical and Subtropical Crops. 258 p.
- Robinson, JC; Galán, V. 2012. Bananos y plátanos. Madrid, ESP. Ediciones Mandí-Prensa. 321 p.
- Romero, M; Díaz, T; Castañeda, D; Arango, R. sf. Diagnostico por PCR del complejo Sigatoka Negra en Colombia.

- Sandoval, J; Müller, L. 1999. Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa AAA*). CORBANA 24(51):43-60.
- Saville, AC; Charles, M; Chavan, S; Muñoz, M; Gómez-Alpizar, L; Ristaino, JB. 2017. Population structure of *Pseudocercospora fijiensis* in Costa Rica reveals shared haplotype diversity with southeast Asian populations. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0047-R>
- Saville, AC; Ristaino, JB. 2018. Development of an early diagnostic assay for the detection of *Mycosphaerella fijiensis* using loop-mediated amplification (LAMP). Progress Report: January 2018. North Caroline State University.
- Simmonds, NW; Shepherd K. 1955. Taxonomy and origins of cultivated bananas. *Botany* 55 (4):302-312.
- Soto, M. 1990. Bananos: Cultivo y comercialización. San José, CR, Litografía e Imprenta LIL, S.A., 648 p.
- Soto, M. 2014. Bananos: Conceptos básicos. Cartago, CR. Tecnológico de Costa Rica. 338 p.
- Stover, RH. 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantains. *Plant Disease* 64:750-756.
- Torrado-Jaime, M; Castaño-Zapata, J. 2008. Incidencia y severidad de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach et Mulder) del plátano según los estados fenológicos. *Agronomía Colombiana* 26(3):435-442.
- Vázquez-Euán, R; Martínez Bolaños, L; Tzec-Simá, M; Garrido-Ramirez, E. 2012. Presencia de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra, en desechos vegetales en las plantaciones. Pag. 7-20. *In* Innovaciones para el manejo integrado en campo de la Sigatoka Negra en México. Aportaciones a la investigación básica. Yucatán, México.

- Vizcaíno, D; Betancourt, R. 2013. Guía de buenas prácticas agrícolas para banano: Inocuidad de los alimentos (en línea). Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, ECU. Consultado 14 mar. 2018.
- Viljoen, A; Mahuku, G; Massawe, C; Ssali, R; Kimunye, J; Mostert, G; Ndayihanzamaso, P; Coyne, D. 2017. Banana diseases and pest: fields guide for diagnostics and data collection. Ibadan, Nigeria, IITA. 73 p.
- Washington, JR; Cruz, J; López, F; Fajardo, M. 1998. Infection studies of *M. fijiensis* on banana and the control of black sigatoka with chlorothalonil. Plant Dis 82:1185-1190.
- Webster, J; Weber, R. 2007. Introduction to fungi. 3 ed. Cambridge University. 841p.
- Zadocks, C; Schein, R. 1979. Epidemiology and plant disease management. New York, Oxford University Press. 427 p.

## **CAPÍTULO II. Detección, cuantificación y monitoreo molecular temprano de Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*) en plantas de banano (*Musa AAA*)**

### **2.1. RESUMEN**

El objetivo de la presente etapa de la investigación fue realizar un monitoreo molecular temprano de *Pseudocercospora fijiensis* en la planta de banano mediante la cuantificación del ADN de *P. fijiensis* y su relación con la infección foliar de la enfermedad Sigatoka Negra (% de área foliar necrosada) para predecir posteriormente los niveles de infección (%) mediante la utilización de variables climáticas. La investigación fue planteada en dos etapas. En la primera se realizaron pruebas de calibración para determinar los síntomas de la enfermedad, la sensibilidad de la técnica qPCR para amplificar dos secuencias del genoma del hongo (ITS y  $\beta$ -tubulina) y la especificidad de los *primers* (MF137/R635 y MFBF/MFBRtaq) para la detección y cuantificación específica de *P. fijiensis* presente en hojas naturalmente infectadas por el patógeno. Se detectó y cuantificó el ADN del hongo en muestras de 10 cm<sup>2</sup> obtenidas de la parte distal derecha desde la hoja candela en estado 0.4 hasta la hoja posición 7 y se determinó que la hoja posición 1 fue la óptima para realizar la cuantificación semanal del ADN del patógeno, esta variable se interpretó como la cuantificación de los procesos tempranos de crecimiento del hongo en el tejido, desde la hoja candela hasta la hoja posición 1 en la planta. En la segunda etapa se realizó la cuantificación semanal del ADN de *P. fijiensis* presente en muestras de la parte distal derecha de hojas posición 1 durante 16 semanas en plantas con y sin aplicación de fungicidas (CF y SF). Se determinó que la cantidad de ADN del hongo varía entre semanas de evaluación, observándose un efecto significativo del fungicida sobre la cantidad del ADN de *P. fijiensis* y el efecto del clima (precipitación) cuando la hoja posición 1 estuvo en el estado de hoja candela en la planta de banano.

**Palabras clave:** Sigatoka Negra, qPCR, detección temprana, cuantificación temprana, monitoreo molecular, infección foliar.

## 2.2. ABSTRACT

The objective of this chapter was to perform an early molecular monitoring of *Pseudocercospora fijiensis* in the banana plant by quantifying the fungi's DNA and its relationship with the foliar infection of Black Sigatoka disease (% of necrotic leaf area), to subsequently predict infection levels (%) by using climatic variables. The investigation was presented in two stages. In the first, calibration tests were performed to determine the symptoms of the disease, the sensitivity of the qPCR technique to amplify two sequences of the fungal genome (ITS and  $\beta$ -tubulin) and the specificity of the primers (MF137 / R635 and MFBF / MFBRtaq) for the detection and specific quantification of *P. fijiensis* present in leaves naturally infected by the pathogen. DNA extraction was performed on 10 cm<sup>2</sup> foliar samples taken from the distal part from the cigar leaf in state 0.4 to position seven. It was determined that the leaf position 1 was optimal for weekly quantification of the pathogen, this variable was interpreted as the quantification of the early growth processes of the fungi in the tissue, from the cigar leaf to the leaf position 1 in the plant. During the second stage of research, weekly measurements of *P. fijiensis* DNA were taken from the right distal part of leaves in position 1 during 16 weeks, in plants with and without application of fungicides (CF and SF). It was determined that the amount of DNA of the fungus varies between weeks of evaluation, observing a significant effect of the fungicide on the amount of DNA of *P. fijiensis* and the effect of weather (precipitation) when the leaf in position 1 was in the state of cigar leaf in the banana plant.

**Key words:** Black Sigatoka, qPCR, early detection, early quantification, molecular monitoring, foliar infection.



## 2.3. INTRODUCCIÓN

La producción de banano en Costa Rica y en otros países requieren de un manejo integrado para mitigar el efecto de la enfermedad Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*) y reducir su efecto sobre la productividad de las plantaciones (CORBANA 2011).

En las plantaciones de banano, la enfermedad Sigatoka Negra llega a causar la destrucción del tejido foliar (>50 %), reduce la capacidad fotosintética, reduce el número de hojas a floración y llenado del fruto, ocasionando problemas en la maduración y el peso del racimo destinado para la comercialización (Hidalgo *et al.* 2006, Chillet *et al.* 2009, Martínez *et al.* 2011, Lazo *et al.* 2012, Castelan *et al.* 2012, Castelan *et al.* 2013). El manejo integrado de enfermedades incluye el uso de fungicidas, los cuales conforman el 83 % de los plaguicidas utilizados en la producción de banano de Costa Rica (CORBANA 2011).

El clima es uno de los factores que condicionan el patosistema Sigatoka Negra-*Musa* AAA al regular los procesos biológicos del patógeno y del hospedero. Los procesos de germinación, penetración y liberación de inóculo son influenciados por las condiciones de altas precipitaciones y temperaturas entre 26 °C - 28 °C (Orozco-Santos *et al.* 2008), esto hace muy compleja la predicción de los niveles de la enfermedad en las plantaciones (Quirós y Guzmán 2010).

En particular, las primeras etapas del proceso de infección como la germinación de esporas (conidios y ascosporas) y la invasión del tejido foliar a través de estomas, resulta en eventos exitosos de infección. Cuantificar en forma temprana la cantidad de dichos eventos es clave para estimar posteriormente los niveles de área foliar afectada (%) por la enfermedad Sigatoka Negra (Sánchez-García *et al.* (2013). Esto presupone la necesidad de métodos para detectar en forma específica y sin ambigüedades el patógeno. Una de las técnicas más precisas y sensibles es la amplificación de regiones específicas del genoma del hongo, mediante la técnica conocida como PCR en Tiempo Real.

Ante este panorama, surge la necesidad de establecer una metodología para el monitoreo molecular de *P. fijiensis*; con el objetivo de realizar una detección y cuantificación temprana del ADN del hongo y su relación con la variable de infección (%), así como el efecto de los fungicidas y las condiciones climáticas sobre la evolución de los síntomas de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano.

## 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1. Localización y periodo de estudio

La investigación se llevó a cabo en las parcelas experimentales de Standard Fruit Company de Costa Rica S.A. (DOLE); Departamento de Investigaciones, ubicado en la localidad de Río Frío, Horquetas, Sarapiquí, Heredia, Costa Rica. Su ubicación exacta está dada por las coordenadas geográficas 10°18'29,9" Latitud Norte y 83°52'59,6" Longitud Oeste. Finca Río Frío se ubica a 109 msnm, presenta suelos del orden Inceptisoles, bien drenados y texturas medias (franco arenoso y franco limoso) según Arias *et al.* (2010). La zona presenta precipitaciones anuales que van desde 3571 mm hasta 5491 mm; con una temperatura promedio anual de 26,1 °C y una humedad relativa promedio alrededor del 84 %, según datos obtenidos de la estación agroclimatológica de Río Frío (2010-2017). La investigación se llevó a cabo de febrero a julio del 2018.

### 2.4.2. Establecimiento y manejo del experimento

Se utilizaron plantas de banano del clon Enano Ecuatoriano (*Musa AAA*) en fase V (de producción *in vitro*, enraizadas, desarrolladas en vivero y terminadas para siembra en campo) provenientes del vivero Finca 9 ubicado en Río Frío (DOLE). El área de estudio presenta abundante inóculo natural de *P. fijiensis* en el ambiente, debido a su cercanía con las plantaciones comerciales de banano. Las parcelas experimentales se establecieron en el área de la Colección de Musáceas debido al espacio disponible y su cercanía con la estación agroclimatológica.

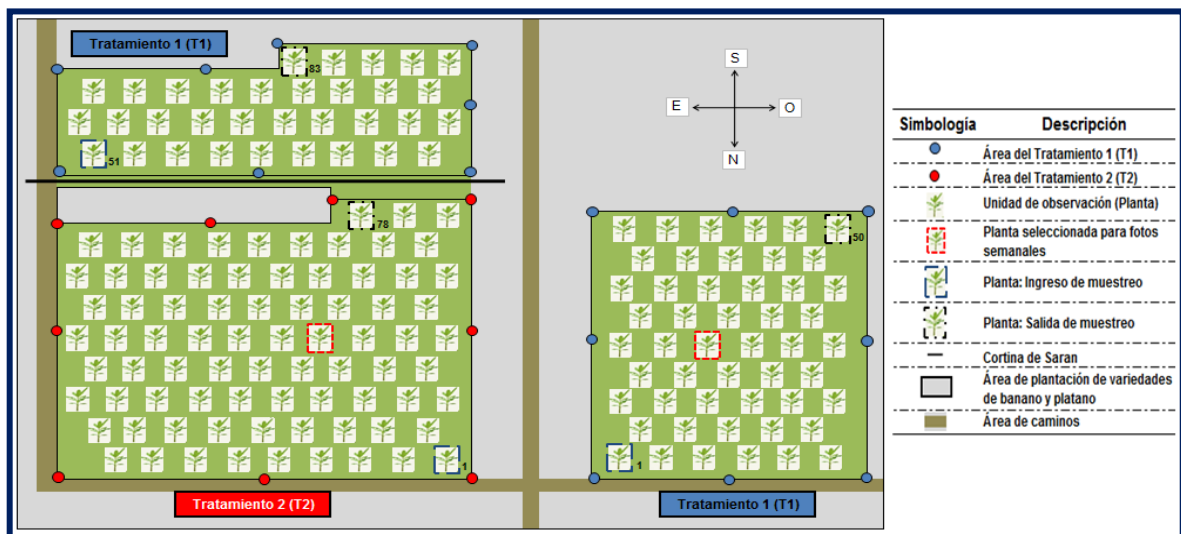
Las plantas del experimento se sembraron bajo el arreglo de siembra tresbolillo, con espaciamiento de 2,77 metros entre plantas y 2,40 metros entre filas, para obtener una densidad de 1.503 plantas por hectárea (Figura 10). Desde la siembra, las plantas recibieron manejo de fertilización comercial, mediante la implementación del plan nutricional recomendado por la empresa DOLE para plantaciones de renovación; además se efectuaron aplicaciones foliares de macro y micro elementos, y la aplicación de nematicidas/insecticidas debido a la presencia de

*Radopholus similis* y *Cosmopolites sordidus*. Durante el desarrollo de las plantas se realizaron las labores culturales que obedecen al manejo del cultivo, con excepción de la deshoja y cirugía, en hojas que presentaban síntomas de Sigatoka Negra. Los tratamientos establecidos en el experimento se detallan en el siguiente Cuadro.

**Cuadro 2.** Descripción de los tratamientos del experimento. Río Frío, 2018.

Tratamientos	Descripción	Plantas
T1	Sin aplicación de fungicidas	83
T2	Con aplicación de fungicidas*	78

\* Corresponde al manejo comercial de aplicaciones de fungicidas para el control de Sigatoka Negra.



**Figura 10.** Condición visual de las Plantas de los tratamientos (8 semanas después de siembra) y el mapa de la parcela experimental. **T1**= Sin aplicación de fungicidas; **T2**= Con aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.

Los tratamientos (T1 y T2) recibieron el mismo manejo agronómico ya mencionado, con excepción de la aplicación de fungicidas en el tratamiento dos (T2), con el uso de una motobomba marca Solo® (modelo 423 Port). Para evitar el riesgo de contaminación por deriva se instaló una cortina de sarán entre ambas áreas destinadas a los tratamientos y se colocaron etiquetas hidrosensibles durante las aplicaciones de los fungicidas en el tratamiento dos (T2).

### **2.4.3. Descripción de la investigación**

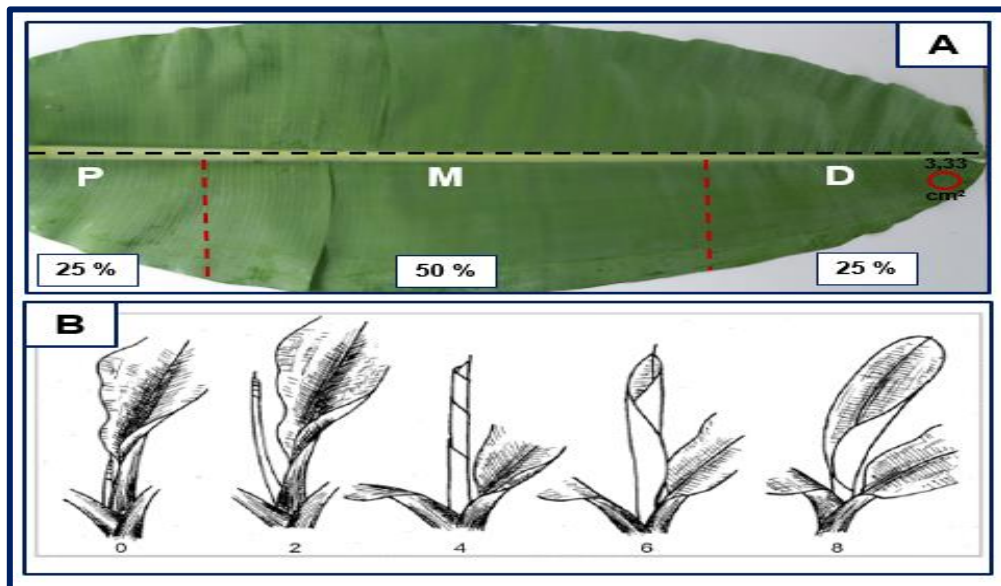
La investigación se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se realizó la calibración del muestreo foliar mediante evaluaciones visuales de la infección de la enfermedad; además se determinó la sensibilidad de la detección y de la cuantificación del ADN del patógeno en las hojas de plantas de ambos tratamientos. En la segunda etapa se llevó a cabo la cuantificación semanal del ADN del hongo en hojas de posición 1 en las plantas de ambos tratamientos, con el objetivo de relacionar los valores obtenidos con el porcentaje de área foliar afectado de una misma hoja, durante las siguientes siete semanas de evaluación. Estas mediciones se repitieron por un lapso de 17 semanas.

### **2.4.4. Etapa 1. Calibración del monitoreo molecular**

#### **2.4.4.1. Evaluación visual de la enfermedad**

Se recolectaron las primeras siete hojas de diez plantas para determinar la infección estimada visualmente (escala de cero a 100 % para el área foliar afectada) por cada hoja individual, así como la zona donde los síntomas tuvieron un mayor avance en la lámina de la misma. Para esto se dividió la hoja en sus tres porciones: distal, media y proximal (Figura 11A), las cuales representaron el 25 %, 50 % y 25 % de la longitud la lámina foliar. Se evaluó la parte distal derecha según la metodología utilizada por el Departamento de Investigación (DOLE). Se recolectaron tres muestras por hoja (disco= 3,33 cm<sup>2</sup>) de la parte distal derecha de hojas en estado candela (Figura 11B) y hojas posición 1 para determinar la presencia del patógeno mediante la tinción con el tinte Rosa Bengala (Balint-Kurti y

Churchill 2004) a una concentración de 10 gramos por litro y con un tiempo de inmersión de 15 minutos. Además, se realizaron inoculaciones artificiales de las esporas del hongo en hojas con y sin fungicidas, estas estuvieron en incubación a 26 °C durante 48 h. Se realizó la observación de los síntomas y estructuras del hongo con un estereoscopio marca Fisher Scientific® y un microscopio marca Olympus® (modelo CX31). Estas evaluaciones se realizaron en el Laboratorio de Sigatoka en Río Frío (DOLE).



**Figura 11. (A)** Representación de la hoja 1 vista por el envés para las evaluaciones de la enfermedad: **P**= proximal, **M**= media, **D**= distal. Río Frío, 2018. **(B)** Grados de apertura de la hoja candela (0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8) según Escala de Brun (1963). Fuente: Fouré y Ganry (2008).

#### 2.4.4.2. Identificación cualitativa y cuantitativa molecular de *P. fijiensis* por medio de PCR

Las muestras de tejido foliar se analizaron en el Laboratorio de Biología Molecular, de la Sección de Fitoprotección de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), ubicado en Guápiles, Limón, Costa Rica.

Las muestras consistieron de discos (3,33 cm<sup>2</sup>) de la parte distal derecha de la hoja, extraídos con un sacabocados metálico; las muestras se colocaron en platos Petri plásticos, debidamente sellados y codificados. Se establecieron cuatro

pruebas de calibración para comprobar la sensibilidad de la identificación cualitativa y cuantitativa de *P. fijiensis* en tejido foliar por medio de las técnicas moleculares de PCR convencional y tiempo real (qPCR). Se usaron los protocolos estandarizados de uso común en las investigaciones conducidas por el Laboratorio de Biología Molecular de CORBANA (Quirós 2005, Quirós y Guzmán 2008, Quirós *et al.* 2008, Quirós y Guzmán 2009a, Quirós y Guzmán 2009b, Quirós y Guzmán 2010)

La identificación cualitativa por PCR convencional se determinó en plantas sin fungicidas, recolectando una muestra de la hoja 1 de tres plantas (P1, P2 Y P3) y se enviaron a secuenciación los productos de PCR por medio de CORBANA para corroborar que la identificación del organismo corresponde a *P. fijiensis*. La cuantificación del ADN del hongo por medio del PCR Tiempo Real Cuantitativo (qPCR) la realizó CORBANA utilizando la técnica de Curvas Estándares, estableciendo diluciones seriales (100.000, 10.000, 1.000, 100, 10 y 1 pg/μl) de ADN puro del patógeno y se estableció una regresión lineal para estimar la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en muestras foliares naturalmente infectadas de acuerdo a la señal de Ciclos de Umbral ( $C_t$ ). Los marcadores moleculares utilizados por CORBANA se detallan en el Cuadro 3.

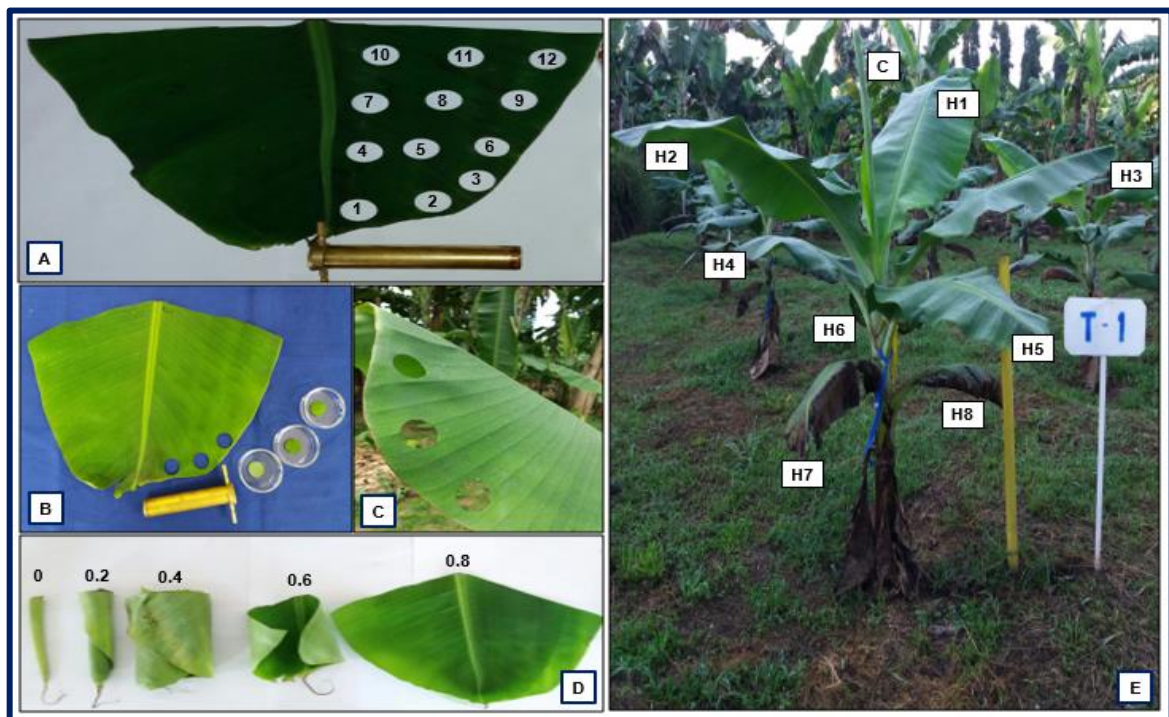
**Cuadro 3.** Marcadores y sonda utilizados por CORBANA para la identificación y cuantificación de *P. fijiensis* en hojas de banano infectadas naturalmente mediante la técnica molecular PCR. 2018.

PCR	Identificación	Secuencia (5'→3')	Ubicación (gen)	Tamaño (pb)	Referencia
Convencional	<b>Marcadores</b>				
	MF137	GGCGCCCCCGGAGGCCGTCTA	ITS	1018	Johanson y Jeger (1993); Johanson <i>et al.</i> (1994)
	R635	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	ITS		
	MFBF	CGACACAGCAAGAGCAGCTTC	β-tubulina	134	Arzanlou <i>et al.</i> (2007)
MFBRtaq	TTCGAAAGCCTTGGACTIONCAA	β-tubulina			
Tiempo Real Cuantitativo (qPCR)	MFBF	CGACACAGCAAGAGCAGCTTC	β-tubulina	134	
	MFBRtaq	TTCGAAAGCCTTGGACTIONCAA	β-tubulina		
	<b>Sonda</b>				
	MFBP	CTGAGCACGACTGACCACAACGCA	β-tubulina		

En el Cuadro 4 se detallan las pruebas de calibración realizadas con el objetivo de determinar la capacidad y sensibilidad de la cuantificación del ADN de *P. fijiensis* en las hojas de la planta, bajo diferentes condiciones.

**Cuadro 4.** Pruebas de calibración para la detección y cuantificación molecular de *P. fijiensis* mediante qPCR. Río Frío, 2018.

Calibración	Descripción	Réplicas	Muestra (Discos=D)
Prueba 1	C1 = Hoja candela sana (parte interna) C2 = Hoja 1 con aplicación de fungicidas C3 = Hoja 1 sin aplicación de fungicidas C4 = Hoja 1 con inoculación artificial	3	1D (3,33 cm <sup>2</sup> ) y 3D (10 cm <sup>2</sup> )
Prueba 2	Hojas de la planta = 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (Figura 12E)	1	1D (3,33 cm <sup>2</sup> )
Prueba 3	Muestreo de 12 discos distribuidos en el área de evaluación de la parte distal derecha (25 %) de la hoja 1 (Figura 12A)	3	1D (3,33 cm <sup>2</sup> )
Prueba 4	Hojas candela = 0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 (Figura 12D)	1	3D (10 cm <sup>2</sup> )



**Figura 12.** (A) Muestreo de toda el área afectada de la parte distal derecha de la hoja (25 %). (B) Método de muestreo determinado para el monitoreo semanal en hojas posición 1. (C) Muestreo de hoja con presencia de fungicidas. (D) Muestreo de los grados de apertura de la hoja candela. (E) Ubicación de las hojas (H1 - H7) de la planta de banano. Río Frío, 2018.



## **2.4.5. Etapa 2. Monitoreo molecular temprano**

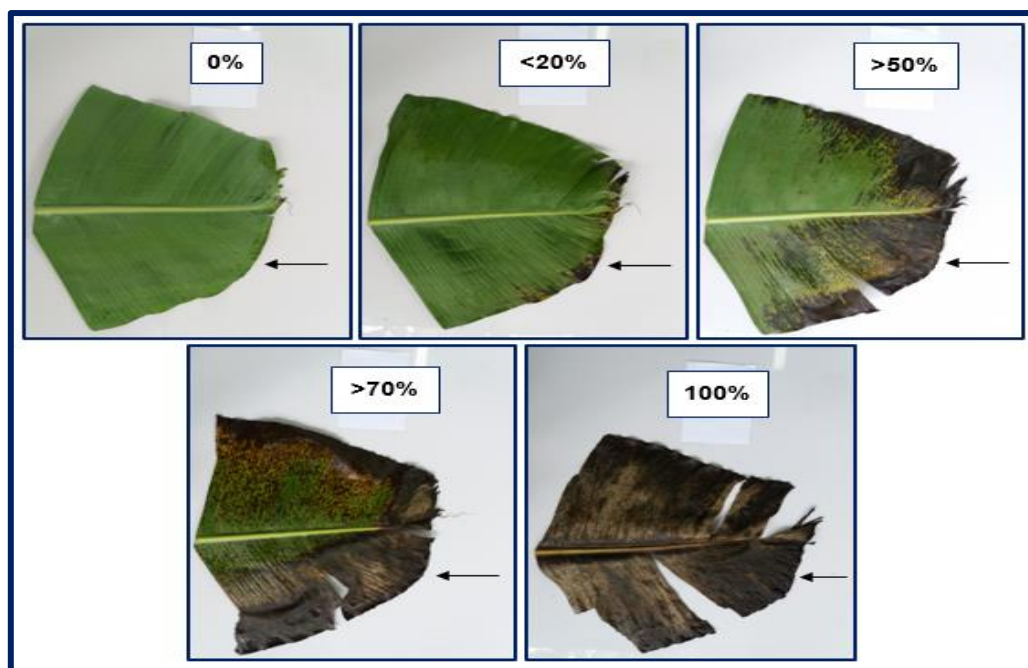
### **2.4.5.1 Cuantificación molecular de *P. fijiensis* por medio de qPCR**

De acuerdo a la calibración de muestreo realizada en la etapa uno, se efectuó el muestreo en hojas posición 1 en plantas de ocho semanas de edad de ambos tratamientos. La muestra compuesta consistió de tres discos que representaban un área foliar de 10 cm<sup>2</sup> (Figura 12B y 12C); se identificó y se codificó la hoja muestreada con cintas de colores y durante 16 semanas fueron llevadas semanalmente al laboratorio de CORBANA para la extracción y cuantificación de ADN de *P. fijiensis*.

El muestreo foliar se realizó a diez plantas por tratamiento, para un total de 20 unidades de observación por semana. El criterio de selección consistió en plantas que presentaban la hoja 1 con el grado de apertura de hoja candela entre 0.4 y 0.6 (Figura 11B) y, por ende, la aleatorización del muestreo de la hoja 1 lo definió la emisión foliar semanal de cada planta.

### **2.4.5.2 Evaluación visual de la enfermedad**

La evaluación visual de la severidad (Figura 13) se realizó en las hojas que fueron muestreadas semanalmente para la cuantificación temprana de ADN de *P. fijiensis*. Se evaluó la parte distal derecha de la hoja. Cada hoja 1 del muestreo semanal se evaluó durante un tiempo de siete semanas para medir el avance de la infección y se llevó la trazabilidad de cada hoja para cada tratamiento.



**Figura 13.** Escala diagramática de infección utilizada por DOLE en la evaluación de Sigatoka Negra (*P. fijiensis*). Parte distal derecha de hojas vistas por el envés. Las flechas en color negro indican la zona evaluada. Río Frío, 2018.

Se utilizaron las siguientes escalas para determinar el grado de severidad y la aparición de los estadios durante las evaluaciones visuales de las hojas de muestreo temprano.

**Cuadro 5.** Escala de Stover modificada por Gauhl (1989) para grados de severidad de Sigatoka Negra en *Musa* AAA. Fuente: Rodríguez-Gaviria y Cayón (2008).

Grado de Severidad*	Descripción de la severidad
0	Sin síntomas
1	<1 % de área foliar afectada y/o hasta 10 estrías
2	1-5 % de área foliar afectada
3	6-15 % de área foliar afectada
4	16-33 % de área foliar afectada
5	34-50 % de área foliar afectada
6	>50 % de área foliar afectada

\*= La parte distal derecha de la hoja (25 % de su longitud) representa el 100 % del área foliar evaluada

**Cuadro 6.** Escala de Fouré (1985) para estadíos de Sigatoka Negra en *Musa* AAA. Fuente: Rodríguez-Gaviria y Cayón (2008).

Estadío	Descripción
1	Pequeñas decoloraciones menores a 1 mm de longitud, de color blanco-amarillento, visibles solo en el envés de la hoja. No son visibles a contraluz
2	Estrías de 2-3 mm de longitud de color café rojizo, visibles en haz y envés
3	La estría aumenta su grosor y longitud, se mantiene de color café rojizo
4	Manchas ovales de color café en el envés y negro en el haz
5	Manchas negras rodeadas de un halo amarillento y centro semihundido
6	Manchas con centro hundido de color blanco grisáceo

#### 2.4.6. Variables de estudio

En el muestreo semanal de cada planta se determinaron las variables de crecimiento como: altura (cm), circunferencia (cm), hojas totales, grados de apertura de la hoja candela, emisión foliar y longitud total de la hoja 1 para determinar el área correspondiente al 25 % de la parte distal. Las variables climáticas de precipitación (mm y horas) fueron obtenidas de la estación agroclimatológica ubicada a 800 m del experimento.

En el Cuadro 7 se detallan las principales variables evaluadas. Las evaluaciones de infección corresponden a la cuarta, quinta, sexta y séptima SDM (Semanas Después de Muestreo) y durante esas semanas se registró el cambio de posición de la hoja en la planta.

**Cuadro 7.** Descripción de las variables determinadas en las plantas de los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.

Variables de Estudio	Descripción	Abreviatura
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log <sub>10</sub> *	Muestreo foliar de la hoja 1.	ADN H1
Infección 4 SDM (%)		S 4 SDM (%)
Infección 5 SDM (%)	Evaluación visual del área foliar necrosada (%).	S 5 SDM (%)
Infección 6 SDM (%)		S 6 SDM (%)
Infección 7 SDM (%)		S 7 SDM (%)

\* = Variable recolectada durante el muestreo temprano de la hoja 1, 4 semanas antes de la evaluación de infección (%). SDM = Semanas Después de Muestreo.

Los datos obtenidos por la cuantificación de ADN fueron reportados por el laboratorio como concentraciones (pg/2 µl), de acuerdo a la cantidad de solución de ADN utilizada en la reacción de PCR Tiempo Real (2 µl) y los valores se expresaron en términos de muestra foliar (pg 10 cm<sup>-2</sup>), para ello se aplicó transformación logarítmica (log<sub>10</sub>), empleándose la siguiente fórmula:

$$ADN (pg\ 10\ cm^{-2}) = \log_{10} \left[ \left( \frac{Pf (pg)}{2\ \mu l} \right) \times (50\ \mu l\ ADN) \times \left( \frac{2000\ \mu l\ Extracción\ (10\ cm^2)}{1500\ \mu l\ Alicuota} \right) \right]$$

#### 2.4.7. Diseño experimental

Se aplicaron dos tratamientos; con y sin fungicidas, en dos áreas separadas. Se seleccionaron semanalmente al azar 10 plantas que se consideraron repeticiones. El análisis del experimento se ejecutó mediante un modelo de diseño completamente al azar.

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

En donde:

$\mu$  = media general

$T_i$  = efecto del *i*-ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental o aleatorio

#### 2.4.8. Análisis de datos

Se realizó el análisis estadístico para determinar diferencias significativas entre las variables de los tratamientos en cada semana por medio de modelos lineales generales y mixtos (MLMix). La heteroscedasticidad se corrigió con la función *varIdent*:  $g(d) = d$ . Se determinaron diferencias significativas mediante el uso de comparación múltiple de LSD Fisher con un nivel de significancia del 5 % (p=0,05). Además, se realizó el análisis de regresión lineal y no lineal con un nivel de significancia del 5 % (p=0,05) y se determinó el R<sup>2</sup>. Se calculó la eficiencia del PCR ( $PCR_{ef} = (-1 + (10^{(-1/pendiente)})) \times 100$ ) para valorar las curvas estándares de estimación de la cantidad de ADN del hongo. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico InfoStat/P (Di Rienzo *et al.* 2018).

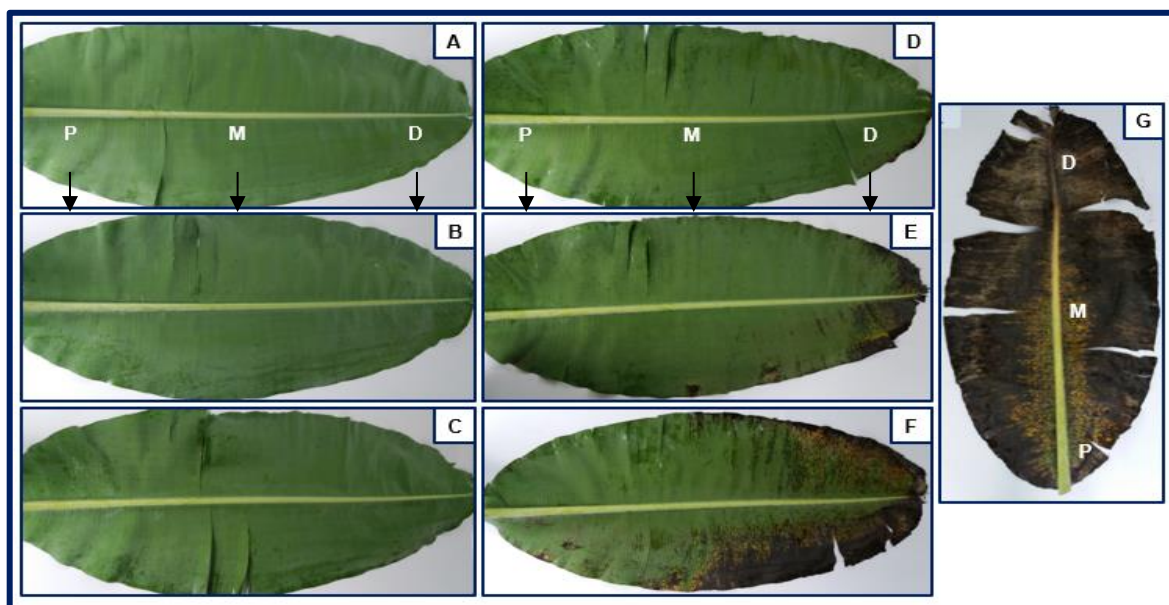
## 2.5. RESULTADOS

### 2.5.1. Etapa I. Calibración del monitoreo molecular de *P. fijiensis*

#### 2.5.1.1. Identificación de síntomas de Sigatoka Negra

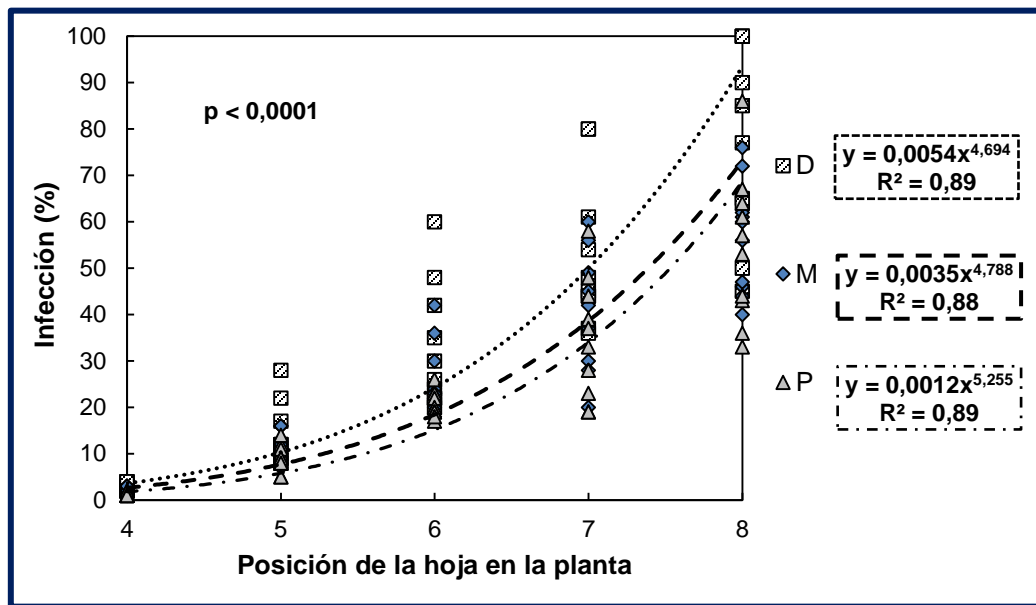
De acuerdo a lo observado en las primeras siete hojas de plantas naturalmente infectadas en ausencia de fungicidas, se determinó que el lado derecho de la hoja presentó los síntomas más avanzados y en su porción distal derecha los síntomas presentaron infecciones mayores que fueron evolucionando hasta la hoja en posición siete de la planta, lo que indicó que la infección en la hoja siete inició al menos 50 días atrás, cuando estuvo en el estado de hoja candela (Figura 14).

Los síntomas de la enfermedad de forma temprana se lograron observar en la hoja cuatro, donde se identificaron los estadios 2, 3 y 4 según la escala de Fouré (1985); sin embargo, en las hojas dos y tres la identificación visual más temprana de los síntomas resultó dificultosa por presentarse síntomas poco claros visualmente, excepto con el uso de magnificación o estereoscopios.



**Figura 14.** Evaluación visual de síntomas de Sigatoka Negra en las hojas de plantas naturalmente infectadas y en ausencia de fungicidas, vista por el envés. **A-G** = Hojas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. **P**= proximal; **M**= media; **D**= distal. Río Frío, 2018.

La evaluación visual de la infección presente en las porciones de las hojas, utilizando la escala visual de cero a 100 % del área foliar afectada (infección); indicó que existe un gradiente en las porciones de la hoja (Distal>Media>Proximal) tal y como se ilustra en la Figura 15. Al marcar las hojas posición 1 de diez plantas y evaluar su infección (%) en cada porción de la hoja durante ocho semanas (hojas posición 1 hasta ocho), se observó que la evolución de la severidad siguió en el tiempo (semanas) una tendencia de regresión potencial ( $p < 0,0001$ ) para la porción distal derecha ( $R^2=0,89$ ), media ( $R^2=0,88$ ) y proximal ( $R^2=0,89$ ).



**Figura 15.** Evaluación de la infección de Sigatoka Negra en las porciones de las hojas de plantas naturalmente infectadas en ausencia de aplicación de fungicidas. **D**= distal; **M**= media; **P**= proximal. Río Frío, 2018.

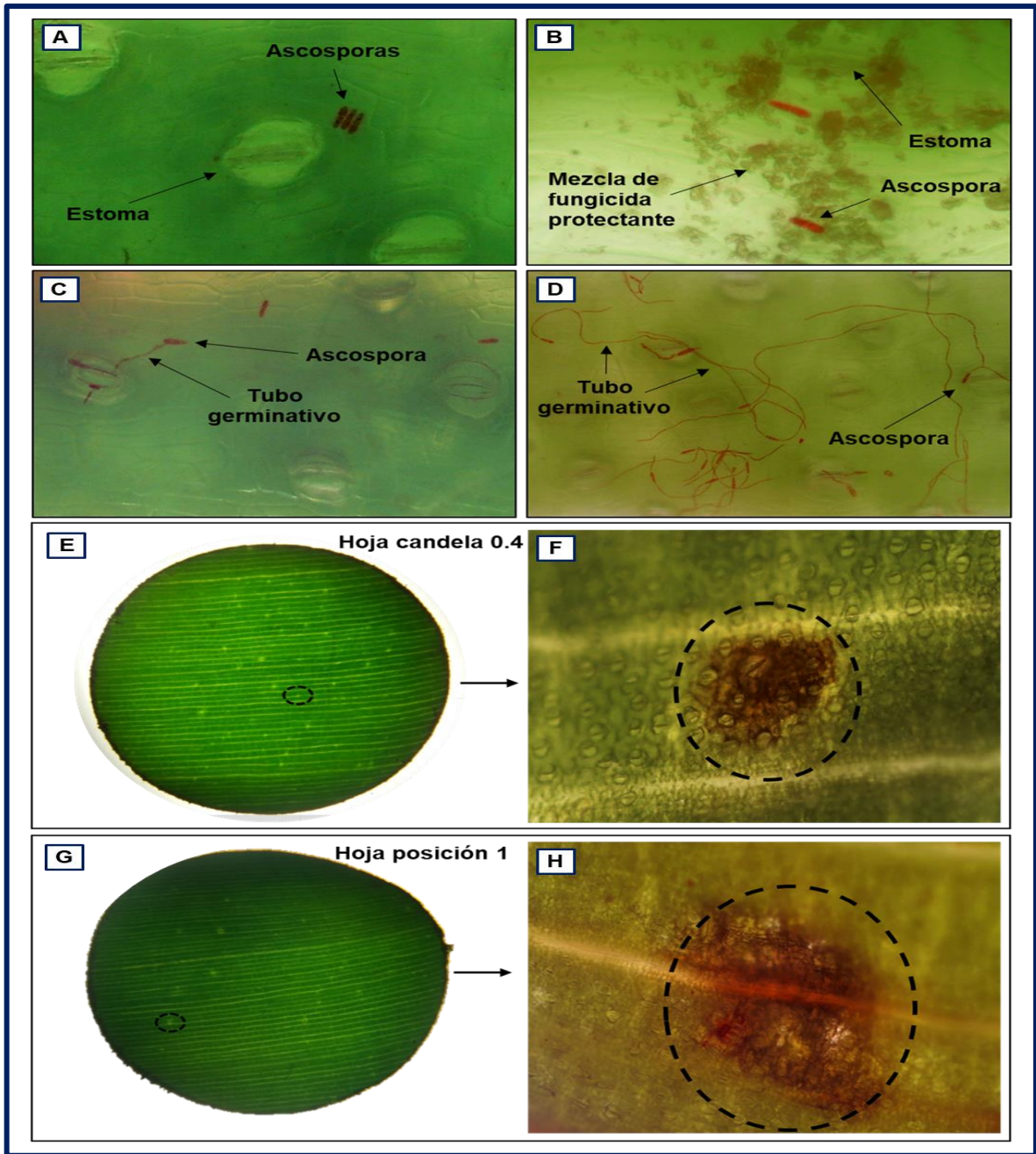
La infección se logró evaluar a partir de la hoja posición 4 en la planta (Figura 15). Las infecciones iniciaron con valores de uno a 10 % del área foliar afectada, en un lapso de tres semanas (posición siete) y algunas hojas llegaron a presentar infección por encima del 50 % en su parte distal derecha y alcanzaron valores por encima del 70 % en la posición de hoja número ocho.

A raíz de los resultados presentados en las Figuras 14 y 15, se determinó que la parte distal derecha de la hoja 1 fue un criterio óptimo e indicativo de la infección temprana, al ser la porción de la hoja expuesta por mayor tiempo (horas) a las condiciones climáticas durante su apertura como hoja estado candela, y en la cual los procesos tempranos como la colonización, germinación y penetración del patógeno en el tejido ocurren desde el desarrollo de la hoja candela hasta llegar a una posición avanzada de hoja, donde los síntomas aún no son visibles (hojas posición 1, 2 y 3).

Siguiendo el protocolo del Laboratorio de Sigatoka de Río Frío de DOLE (mismo detallado por Gómez 2013), se realizó la inoculación artificial de esporas en tejido foliar con y sin aplicación de fungicida protectante (Figura 16A - D) y se identificaron las ascosporas de *P. fijiensis* sobre la superficie de la hoja. En la Figura 16A se ilustran ascosporas sin germinar (0 h de inoculado) cerca de estomas de una hoja que no recibió fungicida protectante, mientras que, por otro lado, se observan ascosporas sin germinar (Figura 16B) que fueron inhibidas por las partículas del fungicida protectante (48 h posteriores a la inoculación).

Al incubar a 26 °C durante 48 horas las muestras de hojas inoculadas del tratamiento sin aplicación de fungicidas, se observó un alto porcentaje de ascosporas germinadas, ingresando por estomas de la hoja de la planta de banano por medio de los tubos germinativos (Figuras 16C y 16D).





**Figura 16.** Identificación de estructuras de *P. fijiensis* inoculadas artificialmente en hojas posición 1 y síntomas tempranos del proceso de infección de Sigatoka Negra, utilizando tinción con Rosa Bengala. **(A)** Ascosporas no germinadas sin presencia de fungicida protectante en la hoja (0h después de inoculado), x400; **(B)** Ascosporas no germinadas con aplicación de fungicida protectante en la hoja (48h después de inoculado), x400; **(C, D)** Ascosporas germinadas sin fungicida protectante en la hoja (48h después de inoculado), x200; **(E, G)** Estadíos uno en hoja candela 0.4 y hoja 1 (x7); **(F, H)** Estadío uno en hoja candela 0.4 y hoja posición 1 (x100). Río Frío, 2018.



Las ascosporas germinadas y no germinadas fueron observadas con poca precisión en las muestras de hojas candela y hojas posición 1, lo cual significó que el patógeno ya había ingresado al tejido de la hoja; sin embargo, se detectó micelio en crecimiento en las muestras de hoja y lesiones muy tempranas con los estadios uno de la enfermedad Sigatoka Negra en todos los grados de apertura de la hoja candela.

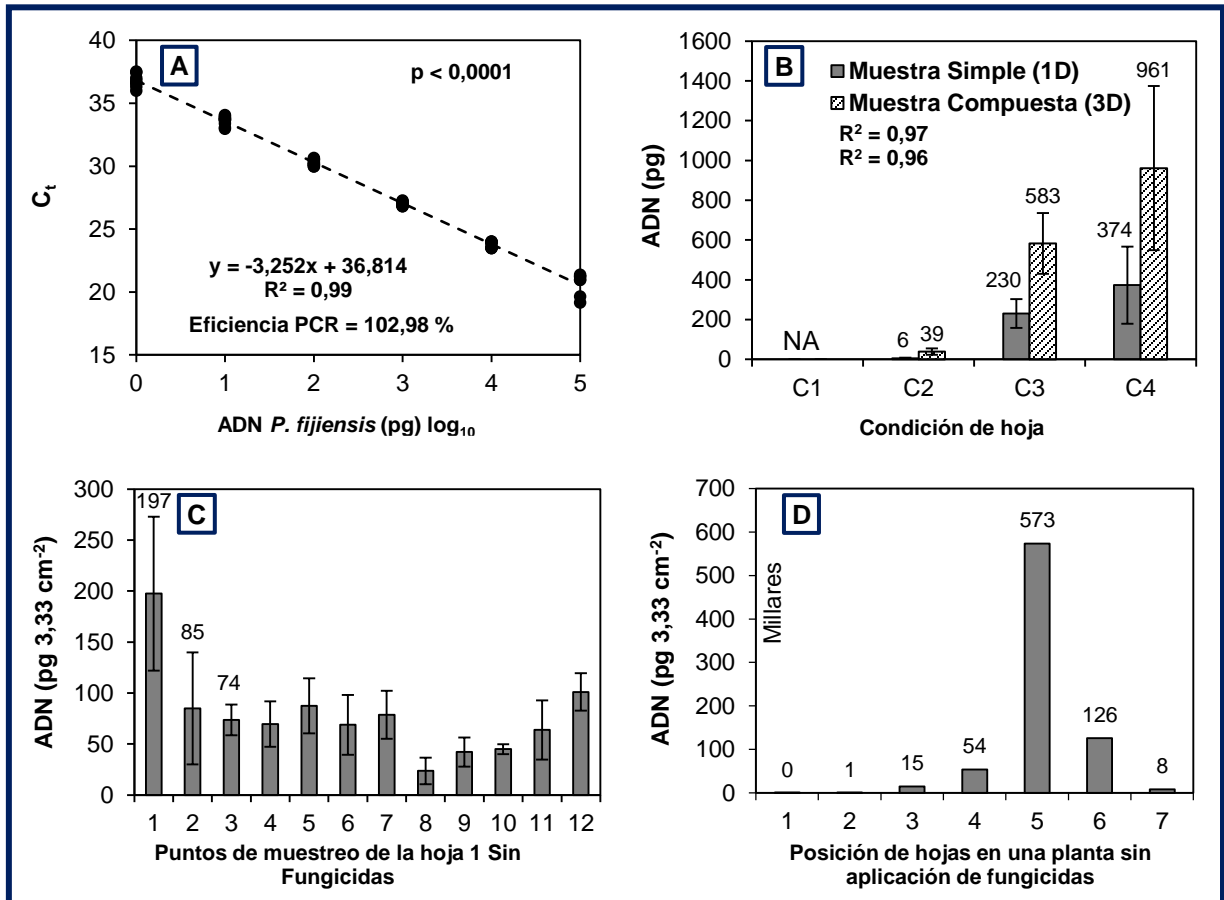
Las Figuras 16E y 16F se observan, a nivel de estereoscopio y microscopio cómo se observan los primeros estadios de afectación en una hoja candela con apertura 0.4 y hojas posición 1 (Figuras 16E y 16G). El área con tinción rojiza (Figuras 16F y 16H) evidenció el crecimiento y la destrucción de células durante el proceso temprano de infección causado por el patógeno *P. fijiensis*, agente causante de la enfermedad Sigatoka Negra.

#### **2.5.1.2. Cuantificación molecular de *P. fijiensis* por medio de qPCR**

Una vez que se determinó la parte distal derecha de la hoja como la idónea, por presentar la mayor infección (% área afectada) y el crecimiento avanzado del patógeno en el tejido, se procedió a realizar la calibración del método de cuantificación de ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1, como se observa en los resultados obtenidos en la Figura 17.

El Laboratorio de Biología Molecular de CORBANA posee protocolos estandarizados para la detección y cuantificación molecular específica del ADN de *P. fijiensis*, y ha determinado previamente en el equipo de PCR Tiempo Real una regresión lineal ( $R^2=0,99$ ;  $p<0,0001$ ) entre la curva estándar (pg) y los ciclos umbrales ( $C_t$ ) de cantidades conocidas de ADN de *P. fijiensis* (pg) extraídas de cultivos puros del patógeno (Figura 17A) y con un valor de eficiencia de PCR del 102,98 % (primers MFBF y MFBRtaq). Lo anterior significa que se estimó la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en el tejido de muestras de hoja naturalmente infectadas y establecieron el valor del  $C_t$  (Figura 21) en la regresión lineal ( $C_t=y$  para estimar la cantidad de ADN del hongo). En el protocolo del laboratorio los valores de  $C_t=20$  indican que las muestras tienen cantidades altas de

ADN ( $\text{pg}=10^5$ ) y valores de  $C_t=37$  es debido a cantidades bajas del ADN de *P. fijiensis* ( $\text{pg}=10^0$ ) en la muestra de tal forma que este fue el ámbito establecido de detección y cuantificación del ADN del patógeno en una hoja naturalmente infectada.



**Figura 17.** Calibración de la cuantificación molecular de *P. fijiensis*. **(A)** Regresión entre la curva estándar y los ciclos umbrales ( $C_t$ ) de cantidades conocidas de ADN de *P. fijiensis*; **(B, C y D)** Cuantificación molecular para determinar la zona de muestreo de la hoja naturalmente infectada. **NA=** No Amplificación; **C1=** Hoja candela sana; **C2=** Hoja 1 con aplicación de fungicidas; **C3=** Hoja 1 sin aplicación de fungicidas; **C4=** Hoja 1 con inoculación artificial del patógeno. Río Frío, 2018.

Con base en los resultados obtenidos y presentado en la Figura 17B, donde se recolectaron muestras de un disco (1D) y muestras compuestas de tres discos (3D), se determinó que el ADN de la hoja de banano no interfiere en la cuantificación del ADN de *P. fijiensis* presente en la hoja, ya que no amplificó (NA) y por lo cual no se cuantificó el ADN del hongo en una muestra de hoja candela totalmente sana (C1).

También se determinó que existen diferencias entre muestras de uno y tres discos en cada una de las condiciones (1D<3D). Además, se observó una tendencia en crecimiento ( $R^2=0,97$  y  $0,96$ ) de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* en las muestras de hoja con aplicación de fungicidas (6 y 39 pg), sin aplicación de fungicidas (280 y 583 pg) y con las muestras donde se realizó la inoculación artificial de estructuras reproductivas del hongo (374 y 961 pg).

Todos los resultados fueron consistentes entre las diferentes condiciones de muestras de hoja 1, al cuantificar cantidades bajas de ADN en una muestra de la plantación comercial (aplicación frecuente de fungicidas) y cantidades altas en las muestras de hoja naturalmente infectada y artificialmente infectada ( $C1<C2<C3<C4$ ). Esto indicó que la técnica molecular de cuantificación molecular es altamente sensible para la detección y cuantificación temprana del hongo *P. fijiensis* en la hoja 1 de la planta de banano.

La segunda calibración (Figura 17C) consistió en la cuantificación del ADN de *P. fijiensis* presente en doce puntos (muestras) distribuidos en la parte distal derecha de hojas posición 1 (Figura 12A) con el fin de determinar variación local en el nivel de crecimiento infectivo del hongo. Se obtuvieron valores promedio relativamente mayores en el punto uno ( $197 \pm 75,45$  pg) y las cantidades de ADN del hongo (pg ADN) se mantuvieron por debajo del valor 100 desde el punto 2 hasta el punto 12. Se observó una variación entre puntos de muestra foliar, donde los bordes registraron valores relativamente mayores en promedio a la parte cercana a la vena de la hoja, como es de esperar basado en la observación visual del patrón de infección.

Con base en los resultados de las Figuras 17A, 17B y 17C se evaluó la sensibilidad y precisión de la técnica PCR Tiempo Real (qPCR) para la detección y cuantificación del ADN de *P. fijiensis* presente en una muestra de hoja naturalmente infectada. Se detectó y cuantificó el patógeno en un momento relativamente temprano de su proceso de infección, como ocurre en la hoja 1, donde una

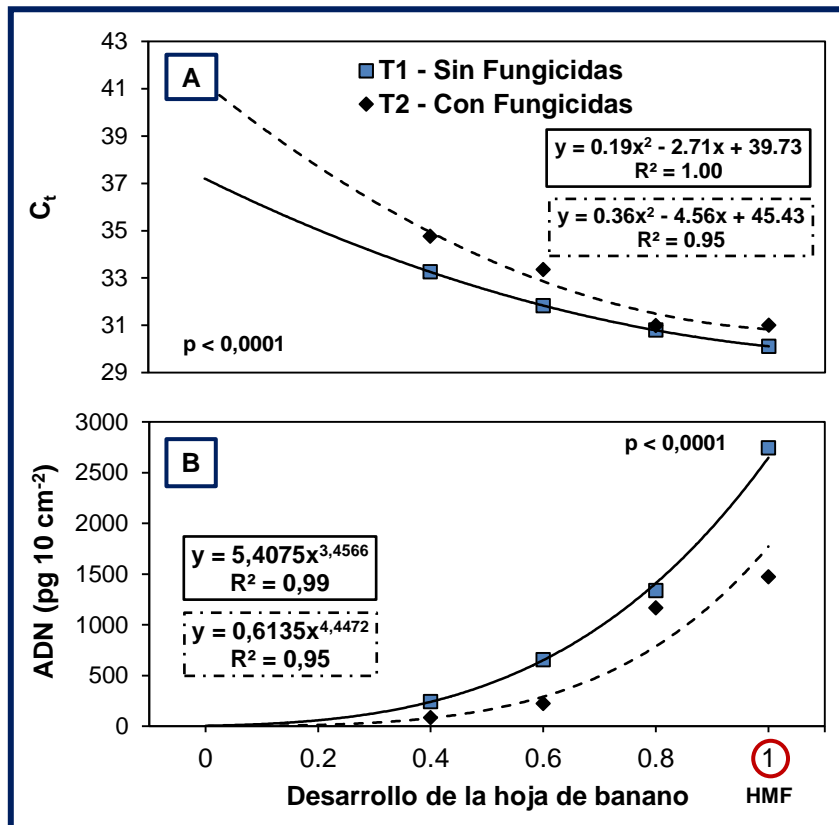
evaluación visual de la enfermedad es imposible para efectos de una estimación temprana de la infección de Sigatoka Negra.

Además, se realizó una tercera calibración (Figura 17D) cuantificando el ADN del hongo (pg) en las primeras siete hojas de una planta de banano en ausencia de fungicidas y se observó que el ADN aumentó en función de la posición de hoja en la planta, desde la uno a la cinco; con una disminución en las hojas seis y siete causado por el colapso y necrosis del tejido, y la probable interferencia de compuestos fenólicos en la reacción de PCR.

Se determinó que la parte distal derecha de la hoja 1 es parte del tejido idóneo para un muestreo temprano, para detectar y cuantificar el crecimiento de *P. fijiensis* durante su proceso de infección en la hoja de banano. Además, se determinó que la muestra foliar compuesta debe corresponder a tres discos de hoja (~10 cm<sup>2</sup>) para efectos del experimento, ya que es posible que un solo disco (3,33 cm<sup>2</sup>) no sea suficiente para que el método pueda detectar y cuantificar el patógeno en muestras de hojas expuestas a condiciones climáticas desfavorables para su crecimiento.

Por lo anterior, se intentó determinar qué tan temprano se puede realizar la detección y cuantificación del ADN del hongo, por lo cual se procedió a medir los pg de *P. fijiensis* presentes durante el desarrollo de la hoja de banano (de candela cero a hoja 1).

De acuerdo con los resultados mostrados en las Figuras 18A y 18B, se determinó una curva de regresión de la relación creciente entre los grados de apertura de la hoja candela (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1) y los pg de ADN de *P. fijiensis* en plantas sin tratamiento de fungicidas ( $R^2=0,95$ ;  $p<0,0001$ ) y con tratamiento de fungicidas ( $R^2=0,99$ ;  $p<0,0001$ ). Los resultados indicaron además el efecto de la aplicación de fungicidas sobre el crecimiento del hongo durante el desarrollo de la hoja de banano (con fungicidas<sin fungicidas).



**Figura 18.** Cuantificación molecular de *P. fijiensis* en los grados de apertura de la hoja candela naturalmente infectada, en plantas con y sin aplicación de fungicidas. **(A)** Curva de los Ciclos de Umbral utilizados en la cuantificación; **(B)** Curva de la cantidad de ADN de *P. fijiensis*; **HMF**= Hoja de muestreo foliar. Río Frío, 2018.

Los resultados de la Figura 18A fueron muy consistentes con relación a las curvas de la Figura 18B, donde la tendencia fue inversa (decrecimiento), debido a que al inicio, en los grados de apertura de hojas candela (0, 0.2 y 0.4) el hongo estuvo en sus etapas tempranas de infección y por lo tanto se presentaron valores altos de  $C_t$  (mayor número de ciclos de amplificación para detectar el ADN del hongo) y este mismo valor de  $C_t$  decreció conforme el desarrollo de la hoja, debido al crecimiento del hongo dentro del mesófilo durante la apertura de la hoja en estado candela, lo anterior se traduce en menos ciclos de amplificación ( $C_t$ ) para detectar y cuantificar las cantidades de ADN presente en cada grado de apertura de la hoja candela en plantas de los tratamientos sin fungicidas ( $R^2=1,00$ ;  $p<0,0001$ ) y con fungicidas ( $R^2=0,95$ ;  $p<0,0001$ ). En resumen, el momento de muestreo foliar más temprano y óptimo fue en la hoja 1, por ser un muestreo menos destructivo.

Los resultados obtenidos en las calibraciones fueron consistentes y confiables, y permitió un muestreo semanal base para el monitoreo molecular temprano de *P. fijiensis* en las hojas posición 1 (muestra= 3 discos= 10 cm<sup>2</sup>) de plantas de los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas.

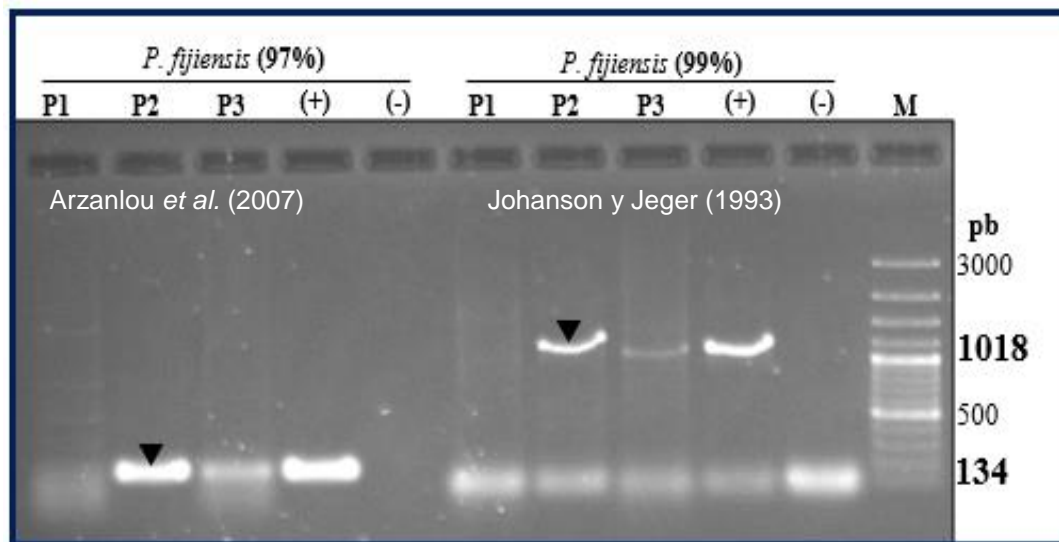
### **2.5.1.3. Identificación molecular cualitativa de *P. fijiensis* por medio de PCR convencional**

Los resultados de calibración obtenidos con los servicios de CORBANA fueron muy consistentes para la detección y cuantificación molecular específica de *P. fijiensis* en hojas de banano naturalmente infectadas, al utilizar marcadores (*primers*) específicos ya reportados en la literatura (Cuadro 3), en sus protocolos de PCR convencional y tiempo real estandarizados para la identificación específica del patógeno en estudio. Dichos resultados de la identificación cualitativa (PCR convencional) se ilustran en la Figura 18 donde se observó la especificidad de los marcadores para la detección del hongo de la enfermedad Sigatoka Negra presente en muestras de hojas posición 1 naturalmente infectadas, al obtener el mismo producto de PCR para el gen de la  $\beta$ -tubulina (134 pb) y la región ITS (1018 pb) de la muestra de control positivo (+) proveniente de la extracción del ADN de cultivos puros del hongo *P. fijiensis*.

Para los marcadores del gen de la  $\beta$ -tubulina (MFBF y MFBRtaq) utilizados también en la técnica de PCR Tiempo Real, se obtuvo un producto de PCR específico de 134 pb, presentando una banda más intensa en la muestra de la planta P2 y una banda tenue en la muestra de la planta P3 y mientras en la muestra de la planta P1 se observaron fragmentos inespecíficos de variados tamaños (cantidad baja de ADN del hongo).

Con las mismas muestras se evaluaron los marcadores para la región ITS (MF137 y R635) y se obtuvo un fragmento específico de 1018 pb y con el mismo resultado de banda más intensa en la muestra P2 y menos intensa en la muestra P3, mientras que no se observó ningún fragmento en la muestra P1. Estos

resultados se deben posiblemente a una diferencia en la cantidad de inóculo presente en hojas posición 1 de diferentes plantas (P1<P3<P2).



**Figura 19.** Gel de agarosa (1 %) de los productos de PCR para los marcadores específicos de *P. fijiensis*:  **$\beta$ -tubulina**= MFBF y MFBRTaq (134 pb); **ITS**= MF137 y R635 (1018 pb). **M**= Marcador molecular (100 pb); **(-)** = Control negativo; **(+)** = Control positivo (*P. fijiensis*); **P1 a P3**= Hojas posición 1 de plantas naturalmente infectadas; **▼**= Valores en porcentaje corresponden al resultado de identificación por medio de análisis bioinformático de los productos de PCR secuenciados por CORBANA.

Los resultados obtenidos en la Figura 19 fueron determinantes para demostrar la especificidad de los marcadores para la identificación molecular del hongo en una muestra de hoja 1 naturalmente infectada, utilizando como comparación otros marcadores (ITS). Sin embargo, para tener certeza de la identidad de los productos de PCR amplificados, por medio de los servicios de CORBANA se enviaron a secuenciación (▼) los productos de PCR de la muestra de la planta P2.

Los resultados de la secuenciación indican que la identificación del microorganismo en estudio correspondió en un 97 % ( $\beta$ -tubulina) y 99 % (ITS) al patógeno *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra en las plantas de banano.

## **2.5.2. Etapa II. Monitoreo molecular temprano de *P. fijiensis***

### **2.5.2.1. Cuantificación molecular temprana de *P. fijiensis* en plantas con y sin aplicación de fungicidas por medio de qPCR**

Con base a los resultados obtenidos en la etapa I, se desarrolló y estandarizó la metodología con la que se realizó el monitoreo molecular temprano en la hoja posición 1 de las plantas de tratamientos sin (T1) y con fungicidas (T2), durante 16 semanas que se extendieron desde la semana 8 hasta la semana 23 del 2018.

En el Cuadro 8 se resumen los resultados de las variables de crecimiento determinadas en las plantas donde se realizó el monitoreo molecular temprano. No se registraron diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos (con y sin fungicidas) para las variables de AHE, altura, circunferencia, y la emisión foliar. Esto fue importante para asegurar un crecimiento homogéneo de las plantas en ambos tratamientos y dichas variables no influyeron en los resultados del monitoreo molecular (cuantificación ADN). De igual manera, la aplicación de fungicidas no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas y los resultados obtenidos en el monitoreo molecular por lo tanto se debieron al efecto de la variable de afectación por Sigatoka Negra (infección) y el factor fungicida.

En el Cuadro 9 se detallan los resultados de las curvas estándar determinadas por CORBANA, para cuantificar el ADN de *P. fijiensis* presente en las hojas posición 1 de los tratamientos. Las regresiones lineales para la estimación de la cantidad de ADN (pg) en función del  $C_t$ , mostraron valores altos y significativos de precisión ( $R^2 > 0,99$ ;  $p < 0,0001$ ) con una eficiencia de PCR mayor al 100 % durante el proceso de amplificación del gen específico de la  $\beta$ -tubulina para *P. fijiensis*.



**Cuadro 8.** Determinación del crecimiento de las plantas durante el desarrollo del experimento. Río Frío, 2018.

Tratamientos	Mes	Semana	AHE (cm) <sup>α</sup>	Altura (cm)	Circunferencia (cm)	HT <sup>π</sup>	Emisión Foliar
Sin aplicación de fungicidas (SF)	Febrero	8	20,6±3,5	75,8±10,6	19,9±2,8	6,8±0,9	1,22
	Marzo	10	26,8±1,7	96,8±13,9	24,3±3,2	7,9±0,7	1,25
	Abril	14	37,6±2,6	151,9±17,5	32,1±3,7	9,4±0,9	1,17
	Mayo	18	44,7±3,2	203,4±18,5	42,4±4,4	9,6±0,8	1,38
	Junio	23*	52,3±2,6	246,9±16,3	54,3±4,9	9,1±1,1	0,82
	Julio	27	-	254,7±13,6	58,9±4,2	6,9±1,7	0,40
Con aplicación de fungicidas (CF) <sup>β</sup>	Febrero	8	20,4±3,1	80,1±13,1	20,1±3,8	7,6±0,7	1,18
	Marzo	10	25,5±3,2	98,7±17,3	24,7±4,1	7,9±0,9	1,18
	Abril	14	36,9±6,6	151,6±21,7	31,9±4,9	11,1±0,9	1,07
	Mayo	18	45,7±4,9	198,8±22,9	41,7±5,8	12,3±0,9	1,15
	Junio	23*	54,1±2,4	245,9±20,9	52,4±6,6	13,3±1,4	0,95
	Julio	27	-	260,1±16,6	56,2±4,8	12,1±2,1	0,40

\* = Inicio de la floración (24 Semanas después de siembra)  
 ± = Desviación estándar  
 α = Área de hoja evaluada (25 %)

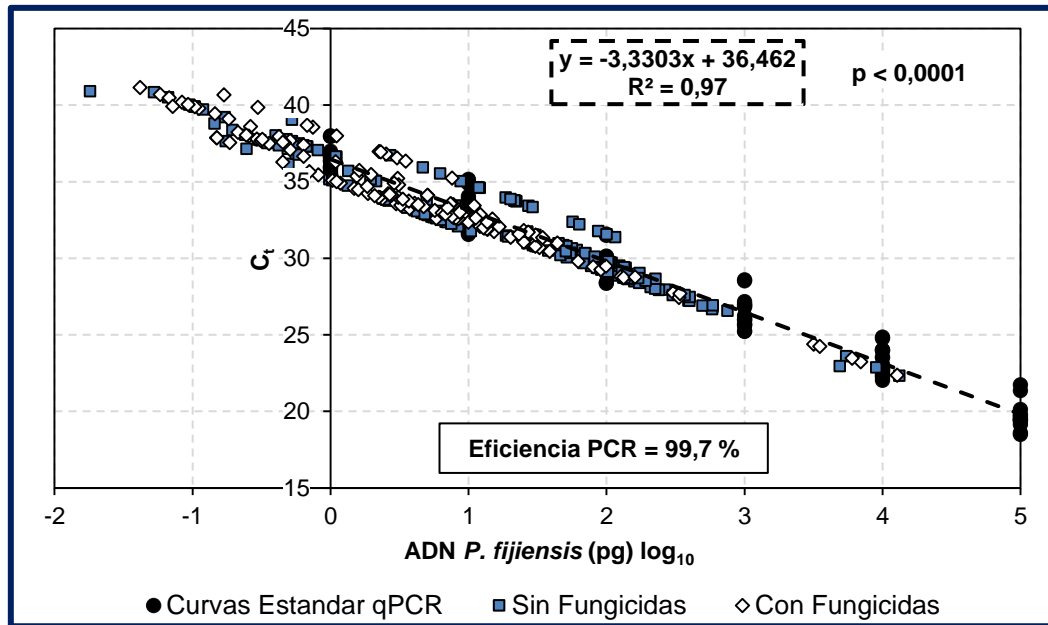
β = Programa semanal de aplicación de fungicidas para áreas comerciales  
 π = Total de hojas

**Cuadro 9.** Curvas estándar determinadas por CORBANA durante las cuantificaciones del ADN de *P. fijiensis* en hojas naturalmente infectadas de plantas con y sin aplicación de fungicidas, desde semana 8 hasta la 23 del 2018.

Análisis qPCR	ADN (pg) log <sub>10</sub> <sup>x</sup>	Ct <sup>y</sup>	Regresión Lineal	R <sup>2</sup>	P>F	Eficiencia PCR (%) <sup>*</sup>
1	0 - 5	21,36 - 37,00	y = -3,19x + 36,76	0,99	<0,0001	105,9
2	0 - 5	19,73 - 36,55	y = -3,32x + 36,01	0,99	<0,0001	100,2
3	0 - 5	18,59 - 35,56	y = -3,30x + 35,15	0,99	<0,0001	100,8
4	0 - 5	21,74 - 38,00	y = -3,28x + 38,10	0,99	<0,0001	101,8
5	0 - 5	19,39 - 35,47	y = -3,20x + 35,55	0,99	<0,0001	105,1
6	0 - 5	19,42 - 36,37	y = -3,32x + 36,13	0,99	<0,0001	100,0
7	0 - 5	19,16 - 36,33	y = -3,30x + 36,43	0,99	<0,0001	100,9

x = Rango de valores de ADN estándar del patógeno expresados al logaritmo (Log<sub>10</sub>)  
 y = Rango de valores Ct determinados por qPCR para los estándares de ADN conocido del patógeno  
<sup>\*</sup> = (-1+(10<sup>(-1/pendiente)</sup>)) x 100

En la Figura 20, se agruparon los resultados de las curvas estándares (Cuadro 9) y las estimaciones del ADN del agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra en función de los valores de  $C_t$  de muestras donde se cuantificó la cantidad específica de ADN de *P. fijiensis*.



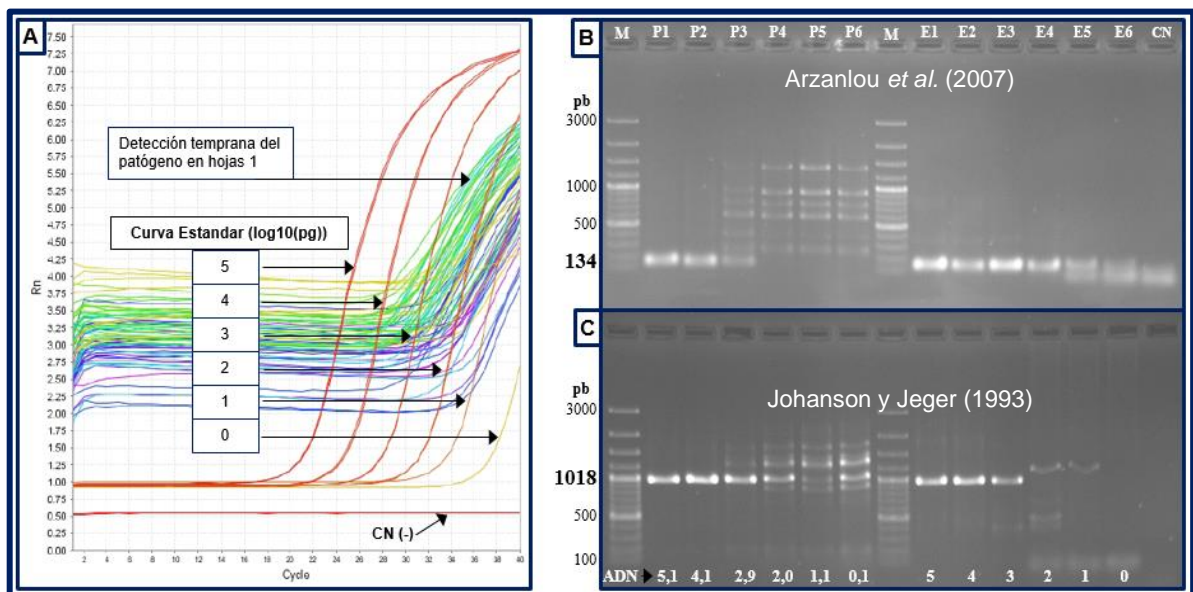
**Figura 20.** Estimación de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en hojas naturalmente infectadas en plantas con y sin aplicación de fungicidas. Datos agrupados de 16 semanas de muestreo molecular temprano (de semana 8 a la 23). Río Frío, 2018.

Los resultados agrupados evidenciaron un efecto de la aplicación de fungicidas sobre la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en las hojas posición 1, donde se registraron un mayor grupo de datos del tratamiento con fungicidas por debajo de  $10^0$  (1) en comparación al tratamiento sin fungicidas. Sin embargo, algunas hojas del tratamiento con fungicidas presentaron valores altos de ADN (pg), aunque con menor frecuencia que el tratamiento sin fungicidas. Aun así, la curva de regresión promedio de la curva estándar obtuvo en promedio un  $R^2=0,97$  ( $p<0,0001$ ) y una eficiencia de PCR promedio del 99,7 %, lo cual es una precisión aceptable.

En estos resultados de agrupamiento es importante recalcar que los datos correspondieron a semanas diferentes (semana 8 hasta la 23 del 2018) donde

influyeron las condiciones climáticas de cada hoja posición 1 y el programa de aplicación de fungicidas; por cual, las variaciones se debieron al ingrediente activo, dosis y la mezcla de fungicidas (protectantes + sistémicos).

En la Figura 21A se observan las curvas de amplificación del PCR de tiempo real para la curva estándar con las diluciones del ADN conocido de *P. fijiensis* ( $\log_{10}(\text{pg}) = 1, 10, 100, 1.000, 10.000$  y  $100.000$ ), las curvas entre los estándares (curvas rojas) representan las muestras de hoja en las cuales se desconocía la cantidad de ADN del patógeno. La detección se registró dentro del ámbito de la curva estándar y presentaron algunas diferencias que se debieron a la cantidad de inóculo en la muestra de hoja naturalmente infectada. Por otro lado, los datos del laboratorio fueron confiables y contundentes al no presentar contaminación por ADN interno y externo en los controles negativos de las pruebas realizadas por el laboratorio de CORBANA.



**Figura 21. (A)** Curvas de amplificación de la detección molecular temprana de *P. fijiensis* en plantas naturalmente infectadas y de las curvas estándar. **(B, C)** Gel de agarosa (1 %) de los productos de PCR para los marcadores específicos de *P. fijiensis*: MFBF y MFBRTaq (134 pb); MF137 y R635 (1018 pb). **M**= Marcador molecular (100 pb); **CN**= Control negativo. Líneas **E1 a E6** corresponden al ADN estándar y líneas **P1 a P6** corresponden a muestras de hojas posición 1 naturalmente infectadas con cantidades de ADN de *P. fijiensis* similares a la curva estándar.

Al final de todas las cuantificaciones de ADN de *P. fijiensis*, se eligieron muestras de hoja posición 1 (P1 a P6) en las cuales ya se habían estimado valores similares a los utilizados en la curva estándar (E1 a E6).

La comparación anterior se presenta en las Figuras 21B y 21C. Se observaron algunas bandas similares en calidad y concentración a los productos de PCR de las muestras de hojas posición 1 (P1, P2 y P3) y las de la curva estándar (E1, E2 y E3). Estas fueron las que tuvieron la mayor cantidad de ADN del patógeno (>3), al presentar bandas más específicas de excelente calidad y concentración para los productos de PCR de ambos marcadores moleculares (134 pb y 1018 pb).

Se encontró que a cantidades menores de 100 pg ( $10^2$ ) de ADN del patógeno en la hoja, ambos marcadores amplificaron productos inespecíficos de diferentes tamaños, mientras que en las diluciones correspondientes de la curva estándar no se presentaron fragmentos inespecíficos.

#### **2.5.2.2. Relación entre la cuantificación molecular temprana (qPCR) y el nivel de infección en plantas con y sin aplicación de fungicidas**

Los resultados presentados en la Figura 20 corresponden a la cuantificación del ADN de *P. fijiensis* realizado desde la semana 8 a la semana 23 del 2018. Como se indicó anteriormente, los resultados se vieron afectados por la aplicación de fungicidas y las condiciones climáticas sobre el crecimiento del patógeno.

Al agrupar los valores obtenidos según la semana de evaluación, se encontraron diferencias entre los tratamientos (SF≠CF) para las variables de ADN (pg) del patógeno en la hoja 1 ( $p=0,002$ ) y el nivel de infección ( $p<0,0001$ ) de las 16 semanas del monitoreo molecular temprano, donde se observó el efecto del fungicida sobre el desarrollo de la enfermedad Sigatoka Negra (Figura 22).

En las Figuras 22A y 22B se ilustran los resultados de la cantidad de ADN y la infección (%) obtenidos en ambos tratamientos. Se observó una relación directa entre la variable de ADN del patógeno cuantificado en la hoja posición 1 y la infección (%) en el momento cuando esa misma hoja fue evaluada a la cuarta

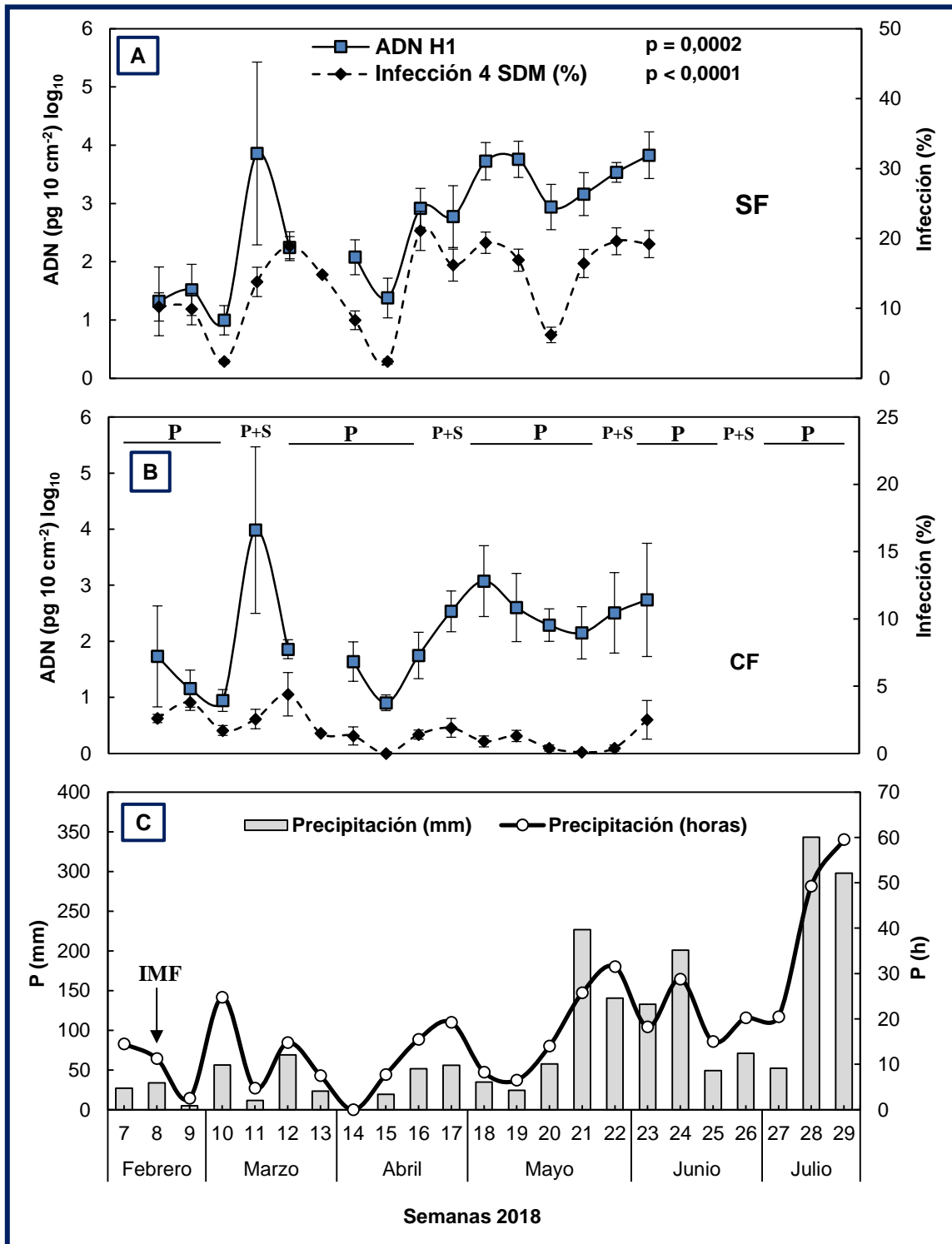
semana, por lo cual las curvas se presentaron traslapadas en las semanas de muestreo.

Por lo anterior, se encontró en la Figura 22A una relación directa entre la variable ADN y la variable infección (%) en el tratamiento SF, al seguir ambas variables la misma tendencia en el transcurso de las semanas. Paralelamente, como se observa en la Figura 22B del tratamiento CF, la tendencia entre las variables se mantiene relativamente en algunas semanas, debido al efecto directo del programa de aplicación de fungicidas sobre la enfermedad y las infecciones se registraron por debajo del 5 %, indicando el efecto de los fungicidas sobre la enfermedad.

En la Figura 22C se detallan las condiciones climáticas de precipitación (mm y horas) durante el desarrollo del experimento y se encontró una relación directa entre el ADN, la infección (%) y las precipitaciones de la semana anterior al muestreo de la hoja 1, cuando está estaba en el estado de candela.

Desde la semana 8 a la semana 14 del 2018, las precipitaciones presentaron variaciones fuertes desde 0 mm hasta 69 mm y las variaciones en las cantidades de ADN del *P. fijiensis* en los tratamientos fueron influenciadas por la variabilidad climáticas de volumen (mm) y duración (horas) acumulada de lluvia. Por otro lado, a partir de la semana 15 hasta la semana 23 del 2018, la variable de cantidad de ADN del hongo presentó menos variaciones en ambos tratamientos y en ese periodo las precipitaciones semanales fueron mayores a los 19,4 mm, y llegando hasta los 226,6 mm. También se observó que la duración de las precipitaciones aumentó (>14 h) y esto favoreció los eventos efectivos de germinación y penetración de las esporas del patógeno, debido a una mayor duración de la humedad sobre la superficie de la hoja.

En el Cuadro 10 se detallan semanalmente las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas para las variables de ADN (pg) en hoja posición 1 y la infección (%) a las cuatro semanas de ser evaluada. También se encontraron diferencias entre tratamientos en los promedios de las variables de estadíos y el grado de severidad.



**Figura 22.** Relación entre la cuantificación temprana del ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1 (H1) y la infección foliar (4 SDM). **(A)** SF= Sin fungicidas; **(B)** CF= Con fungicidas, P= Protectantes, S= Sistémicos; **(C)** Condiciones climáticas de precipitación (mm y horas) durante el desarrollo del estudio. IMF= Inicio del muestreo foliar. Río Frío, 2018.

**Cuadro 10.** Variables de infección de Sigatoka Negra determinadas en plantas con y sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.

Mes	SM <sup>π</sup>	ADN <i>P. fijiensis</i> (pg 10 cm <sup>-2</sup> )log <sub>10</sub> <sup>*</sup>			SE <sup>£</sup>	Infección 4 SDM (%) <sup>*</sup>			Estadíos		Grado de Severidad		Posición de Hoja	
		SF <sup>α</sup>	CF <sup>β</sup>	P>F		SF	CF	P>F	SF	CF	SF	CF	SF	CF
Febrero	8	1,3 a	1,7 a	0,3439	11	10,2 a	2,6 b	0,0016	3	3	3	2	5	5
	9	1,5 a	1,2 a	0,0543	12	9,9 a	3,8 b	0,0174	4	2	3	2	5	5
Marzo	10	1,0 a	0,9 a	0,6261	13	2,4 a	1,7 b	0,1597	3	2	2	2	5	5
	11	3,9 a	4,0 a	0,8552	14	13,8 a	2,6 b	0,0001	4	2	3	2	5	5
	12	2,2 a	1,9 b	0,0002	15	18,9 a	4,4 b	<0,0001	5	2	4	2	5	5
	13	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abril	14	2,1 a	1,6 b	0,0121	17	8,3 a	1,3 b	0,0002	3	2	3	1	5	5
	15	1,4 a	0,9 b	0,0063	18	2,4 a	0,0 b	<0,0001	2	1	2	0	5	5
	16	2,9 a	1,7 b	<0,0001	19	21,1 a	1,4 b	<0,0001	6	2	4	2	5	5
	17	2,8 a	2,5 a	0,2484	20	16,2 a	1,9 b	<0,0001	5	2	4	2	4	4
Mayo	18	3,7 a	3,1 b	0,0098	21	7,4 a	0,9 b	0,0006	4	2	3	1	4	4
	19	3,8 a	2,6 b	<0,0001	22	16,9 a	1,2 b	<0,0001	5	2	4	1	4	4
	20	2,9 a	2,3 b	0,0005	23	6,2 a	0,4 b	0,0001	3	1	3	1	4	4
	21	3,2 a	2,2 b	<0,0001	24	16,4 a	0,1 b	<0,0001	5	1	4	0	4	4
	22	3,5 a	2,5 b	0,0004	25	19,6 a	0,4 b	<0,0001	6	1	4	1	4	4
Junio	23	3,8 a	2,7 b	0,0053	26	19,2 a	2,5 b	<0,0001	6	2	4	2	3	4

\*= Valores en la misma fila con una misma letra no son diferentes estadísticamente (LSD Fisher= 0,05)

α= Plantas sin presencia de fungicidas

π= Semanas de muestreo de la hoja en la posición 1 de la planta

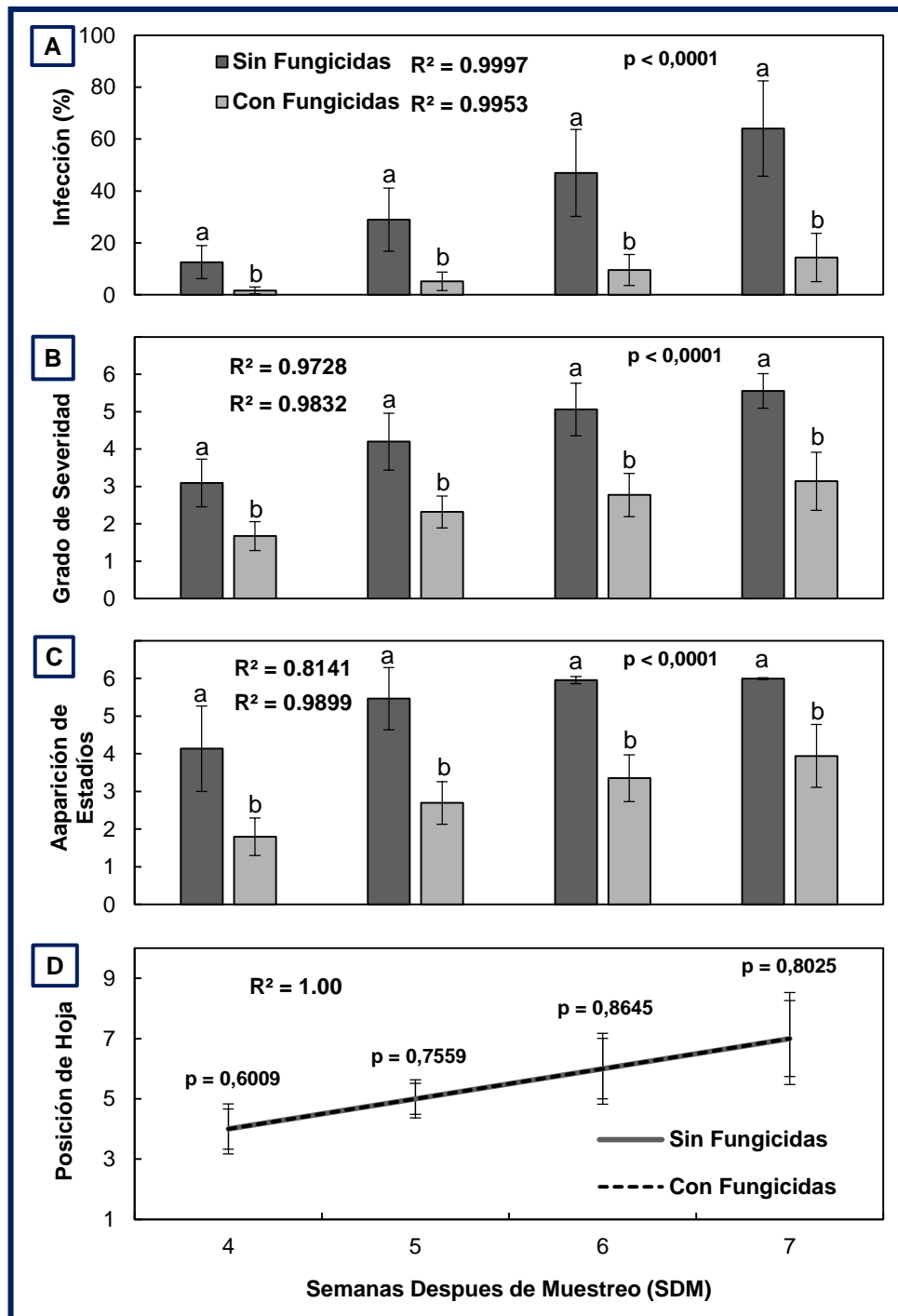
£= Semanas de evaluación visual de síntomas de Sigatoka Negra

β= Plantas con presencia de fungicidas

En las hojas posición 1 donde se realizó el monitoreo molecular temprano para determinar la cantidad de ADN (pg) de *P. fijiensis* presente, se evaluaron visualmente durante siete semanas conforme la hoja fue cambiando de posición en la planta. Sin embargo, lo más temprano que se lograron evaluar de manera visual los síntomas de la enfermedad Sigatoka Negra fue en la semana cuatro después del muestreo. Los resúmenes de los resultados promediados de evaluaciones visuales realizadas desde la cuarta semana hasta la séptima semana se detallan en las Figuras 23A, 23B y 23C; y se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) en las variables del porcentaje de infección, grado de severidad y aparición de estadíos entre ambos tratamientos (SF≠CF), también se observó una tendencia lineal creciente ( $R^2 > 0,80$ ) en los síntomas de la enfermedad durante las semanas de la evaluación (4, 5, 6 y 7) de hojas en los tratamientos.

Por su parte, en la variable posición de hoja (Figura 23D) no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0,60$ ) durante las evaluaciones de los tratamientos,

evidenciando de forma homogénea el cambio de posición de la hoja evaluada en los tratamientos sin y con aplicación de fungicidas.



**Figura 23.** Valores promedio del avance semanal de los síntomas visuales de la enfermedad Sigatoka Negra en la hoja donde se realizó el monitoreo molecular temprano. Río Frío, 2018.



## 2.6. DISCUSIÓN

### 2.6.1. Etapa I. Calibración de la detección y cuantificación del ADN de *P. fijiensis*, agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano para efectos de estimación de la infección foliar

El ciclo de la enfermedad Sigatoka Negra ocurre en un periodo de aproximadamente de 49 días a 52 días cuando las condiciones de precipitación, temperaturas y humedades son las favorables para su acelerado desarrollo en las hojas de la planta de banano (Stover 1980, Marín *et al.* 2003). El proceso de infección inicia cuando las ascosporas son depositadas por efecto del viento sobre la superficie de la hoja en su estado de candela (Guzmán 2003, Marín *et al.* 2003, Soto 2014), siendo la parte distal derecha la más expuesta (inoculación natural) y afectada (desarrollo posterior de síntomas) durante su proceso de apertura y cambio de posición de hoja en la planta.

Los resultados obtenidos en las evaluaciones visuales de síntomas de la enfermedad Sigatoka Negra en las primeras siete hojas de la planta (Figura 14) confirman lo descrito por Marín *et al.* (2003) y Murillo (2015), donde el período de incubación es determinado por el tiempo de duración en aparecer los primeros síntomas de la enfermedad en la hoja (días post-infección). Este periodo en Costa Rica puede ser de 13 días a 14 días (periodo corto) bajo condiciones climáticas favorables y extenderse a 35 días (periodo largo) cuando las condiciones climáticas son desfavorables para el patógeno, mientras que el periodo de latencia (de infección a manchas maduras) es de 25 días durante la estación lluviosa y 70 días en la estación seca, lo anterior explica claramente los resultados obtenidos en las evaluaciones visuales de la enfermedad Sigatoka Negra y donde la infección es condicionada por el clima.

Los resultados de síntomas observados en la cuarta hoja de la planta, corresponden a lo explicado por Manzo-Sánchez *et al.* (2005), mencionan que durante tres a cuatro semanas después del ingreso vía estomática el patógeno invade el mesófilo y avanza entre las paredes celulares, en la fase biotrófica, antes

de la aparición de lesiones necróticas en la hoja o fase necrotrófica. Sin embargo, se debe recalcar que las altas tasas de esporulación (liberación de esporas), los cortos periodo de incubación y latencia están ampliamente influenciados por las condiciones de altas precipitaciones, humedad relativa (>90 %) y temperaturas por encima de 21,5 °C, que favorecen el desarrollo de la enfermedad Sigatoka Negra, mismas condiciones presentadas en la zona del experimento (Marín *et al.* 2003, Gómez 2013, Murillo 2015).

Por décadas se han utilizado herramientas visuales para la detección y evaluación de la enfermedad Sigatoka Negra en las plantaciones comerciales de banano, sin embargo, una de las limitantes que presentan es la evaluación de síntomas que ya causaron un daño importante en el funcionamiento fisiológico de la planta tales como fotosíntesis, respiración, vida verde del fruto, entre otros (Rodríguez-Gaviria y Cayón 2008, Martínez *et al.* 2011). Por lo cual, Pérez-Vicente (2009) y Churchill (2011) indican que el diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad mediante el uso de herramientas moleculares de alta sensibilidad y especificidad como el PCR, permitirá optimizar su control. Estas metodologías moleculares utilizadas en el experimento ya fueron estandarizadas por Johanson y Jeger (1993), Johanson *et al.* (1994), se obtuvo el mismo resultado para la identificación específica de *P. fijiensis* en hojas jóvenes naturalmente infectadas, los autores por su parte lograron diferenciar entre las especies de Sigatoka Negra (*P. fijiensis*) y Sigatoka Amarilla (*M. musicola*). Actualmente la técnica es utilizada con algunas modificaciones para la detección y cuantificación temprana del patógeno *P. fijiensis* (Quirós y Guzmán 2010).

Los resultados obtenidos en las pruebas de calibración (Figura 17 y 18) confirman la alta sensibilidad y especificidad del PCR Tiempo Real para la cuantificación de *P. fijiensis* en hojas natural y artificialmente inoculadas, al obtener valores altos de precisión en la curva estándar con un  $R^2=0,99$  ( $p<0,0001$ ) y un valor de eficiencia de PCR del 102,98 %. Los mismos resultados son comparables a los obtenidos por Arzanlou *et al.* (2007), quienes desarrollaron el diagnóstico molecular cuantitativo del complejo Sigatoka en plantas de banano donde obtuvieron para la

cuantificación una curva estándar con un  $R^2=0,99$  y con una eficiencia de PCR del 88,34 %, logrando cuantificar y encontrar diferencias significativas entre las cantidades de ADN del patógeno en hojas con síntomas tempranos y avanzados de la enfermedad (tempranos<avanzados).

Posteriormente Quirós y Guzmán (2009b) en CORBANA establecieron curvas estándares para la cuantificación del ADN de *P. fijiensis* utilizando el mismo protocolo de cuantificación qPCR (Arzanlou *et al.* 2007), y determinaron una regresión lineal ( $y= -3,43+39,25x$ ) que obtuvo un  $R^2=0,99$  y una eficiencia de PCR del 95,48 %, en teoría mencionan que la eficiencia de la curva estándar debería estar entre 90 % y 110 %, y la pendiente de la recta de regresión obtener valores entre -3,6 y -3,1. Indicando en cada ciclo de amplificación una duplicación perfecta del amplicon (ADN objetivo). Los resultados de los parámetros de las curvas estándar están dentro de los valores teóricos mencionados, lo cual se debió a la estandarización y lo reproducible del método de cuantificación qPCR.

Por otro lado, Quirós y Guzmán (2010) mencionan que los fungicidas ocasionalmente podrían estar siendo aplicados inapropiadamente por lo complejo de una predicción del momento y severidad de la enfermedad en las plantaciones. Los datos obtenidos en las calibraciones indican que es posible realizar una cuantificación temprana del ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1 (~10 cm<sup>2</sup>) de su parte distal derecha y esta funcionó para realizar el monitoreo temprano y que incluso debido a la sensibilidad del método se pueden realizar cuantificaciones tan tempranas a partir de la hoja candela (estado 0.4) en plantas con y sin aplicación de fungicidas, aunque se deben considerar las condiciones lluviosas en las que se realizó el muestreo de hojas en estado de candela.

En este sentido, los resultados de cuantificación en hojas estado candela fueron similares a los obtenidos por Quirós y Guzmán (2010), determinando curvas de regresión potencial ( $R^2=0,92$ ) para el ADN de *P. fijiensis* el cual aumentó en los estados de hoja candela (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1). Igualmente, en el mismo estudio determinaron una curva creciente de regresión polinomial para el ADN en función

del número de ascosporas (500, 400, 300, 200, 100 ml<sup>-1</sup>) donde obtuvieron un valor alto de R<sup>2</sup>=0,98 y determinaron que el ADN de una ascospora equivale a 0,04 pg. También indican que este estudio permitió evaluar la sensibilidad y especificidad de detección del sistema (sondas y *primers*) desarrollado por Arzanlou *et al.* (2007) para el hongo *P. fijiensis* y concluyendo que el ADN de banano no interfiere en las reacciones de qPCR, este último aspecto fue corroborado en este estudio al no cuantificar el ADN del patógeno en una muestra de hoja candela 100 % sana.

Otro punto a resaltar es la especificidad del método, ya que está basado en la amplificación de un segmento específico del genoma del hongo y que incluso permiten la discriminación con otros patógenos. Los resultados obtenidos en la Figura 19 confirman que el PCR es una herramienta confiable para la detección de patógenos como lo fue indicado por Quirós y Guzmán (2008). En los resultados se demostró la especificidad de los marcadores ITS (1018 pb) para la identificación de *P. fijiensis* (99 % similitud) con los *primers* desarrollados por Johanson y Jeger (1993), mismos diseñados para la identificación específica del hongo de la Sigatoka Negra y en el estudio *primers* (MF137 y R635) no amplificaron muestras de los hongos *Mycosphaerella musicola*, *Mycosphaerella minima*, *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium moniliforme* y *Colletotrichum gloeosporoides*, para el caso de la presente investigación esto confirma que no fue un problema la posible presencia de otros patógenos en el tejido foliar.

Con la identificación de la región ITS de *P. fijiensis*, Johanson y Jeger (1993) concluyeron que los *primers* son altamente específicos y la técnica de PCR suficientemente sensible para la detección del ADN del patógeno *P. fijiensis* en muestras de hojas naturalmente infectadas con síntomas tempranos y tardíos, los mismos resultados fueron obtenidos en el presente estudio al identificar el patógeno en tejido foliar con síntomas tempranos de la enfermedad Sigatoka Negra. Por otro lado, los mismos marcadores ITS (1018 pb) han sido utilizados y obteniendo el mismo resultado en la identificación de aislados de *P. fijiensis* en plantaciones de banano en Colombia, Costa Rica, México y Cuba (Romero *et al.* sf, Quirós y Guzmán 2008, Martínez 2012, Leiva-Mora *et al.* 2013, Escobar-Tovar *et al.* 2015).

La misma especificidad se corroboró en los resultados con los *primers* para el gen de la  $\beta$ -tubulina (134 pb), donde la identificación de *P. fijiensis* fue del 97 % de similitud en muestras de hojas posición 1 naturalmente infectadas (síntomas tempranos), los mismos resultados fueron obtenidos por Arzanlou *et al.* (2007). Por otro lado, Vázquez-Euán *et al.* (2012) utilizaron los mismos *primers* para la detección y cuantificación del ADN del patógeno en muestras de pseudotallo y hojarasca de plantaciones de banano en México, donde determinaron que las cantidades del patógeno en hojarasca fueron significativamente mayores a las de otros tejidos de la planta.

El mismo concepto molecular del qPCR (PCR Cuantitativo) mediante la técnica de curvas estándar utilizado en la presente investigación, se ha utilizado para la detección y cuantificación del ADN de otros hongos y bacterias de importancia agrícola como por ejemplo: *Rhizoctonia solani* en frijol (Wen *et al.* 2005), *Botrytis cinerea* en fresa (Tomlinson *et al.* 2010), *Radopholus similis* en banano (Arzanlou *et al.* 2009, Quirós y Araya 2010), *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* en garbanzo (Jiménez-Fernández *et al.* 2010), *Pseudocercospora fuligena* en tomate (Zahn *et al.* 2011), *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en papa (García *et al.* 2013), *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en banano (Zhang *et al.* 2013), *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* en zanahoria (Temple *et al.* 2013), *Guignardia citricarpa* en cítricos (Hu *et al.* 2014), *Xanthomonas albilineans* en caña de azúcar (Garces *et al.* 2014), *Pythium inflatum* en maíz (Cao *et al.* 2016), *Caliciopsis pinea* y *Fusarium circinatum* en pino (Luchi *et al.* 2018).

Por otro lado, con las técnicas moleculares se han desarrollado algunos estudios donde se diseñaron y utilizaron otros *primers* específicos para la identificación de genes de *P. fijiensis*, analizando la variabilidad genética en las poblaciones del patógeno, que explican la patogenicidad, así como los procesos de patogénesis en la interacción *P. fijiensis*-*Musa* AAA y la resistencia a fungicidas utilizados para el combate de Sigatoka Negra (Zandjanakou-Tachin *et al.* 2009, Conde-Ferrández *et al.* 2010, Portal *et al.* 2011, Cools y Hammond 2013, Zandjanakou-Tachin *et al.* 2013, Stergiopoulos *et al.* 2014, Saville *et al.* 2017, Díaz-Trujillo *et al.* 2018).

### **2.6.2. Etapa II. Relación entre la detección y cuantificación del ADN de *P. fijiensis* y su relación con el desarrollo de los síntomas de la enfermedad Sigatoka Negra**

Con base en los resultados obtenidos en la etapa I, se estandarizó la metodología para realizar el monitoreo molecular temprano en la hoja 1 de plantas naturalmente infectadas de los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas.

Lo importante en los resultados obtenidos fue la cuantificación del ADN de *P. fijiensis* y su relación con los síntomas de la enfermedad (% área foliar afectada), para efectos de su uso en predicción. Quirós y Guzmán (2010) indican que, para mejorar la precisión de los fungicidas y otras medidas de combate, es posible proveer pronósticos de la enfermedad con mayor exactitud mediante la detección y cuantificación molecular temprana de la enfermedad Sigatoka Negra. Pérez-Vicente (2009) explica que se han buscado alternativas, que han sido adoptadas para el manejo de la enfermedad en búsqueda de disminuir la dependencia por el uso de fungicidas, y explica que las técnicas de PCR pueden contribuir en la optimización del control de la enfermedad, ya que Sigatoka Negra sigue siendo un factor importante en la industria por el aumento en los costos y limitaciones en la productividad de las plantaciones del trópico húmedo. Sin embargo, la detección y cuantificación per se no son valiosas a menos que se establezcan correlaciones con variables de infección de la enfermedad y variables de clima, para ser utilizados en modelos de predicción.

Los resultados obtenidos en el Cuadro 9 y la Figura 20 de las curvas estándares determinadas en el estudio, para las cuantificaciones del ADN de *P. fijiensis* en muestras de hojas posición 1 naturalmente infectadas para los tratamientos con y sin fungicidas, fueron confiables y reproducibles en las diferentes cuantificaciones realizadas. Se obtuvieron valores de precisión altos y significativos ( $R^2 > 0,95$ ;  $p < 0,0001$ ), con eficiencias de PCR que estuvieron entre el 99 % y 106 %. Dichos resultados están dentro de los parámetros reportados por Quirós y Guzmán (2009b).

Además, en la Figura 20 se observan diferencias significativas entre el contenido de ADN de muestras de hojas con y sin aplicación de fungicidas; y se observó la variabilidad entre muestras del mismo tratamiento en la misma semana de muestreo. Indicando la heterogeneidad de la cantidad de inóculo del patógeno (pg de ADN) en las plantas evaluadas. Lo anterior también fue encontrado por Arzanlou *et al.* (2007) al determinar la variabilidad existente entre las cantidades de ADN del hongo en muestras de diferentes plantas. Los resultados en este estudio se debieron a condiciones climáticas en cada semana y al microclima debido a la ubicación de las plantas en el experimento, así como la dirección de las hojas de la cuantificación temprana del ADN del hongo.

En este caso, el monitoreo molecular temprano realizado durante 16 semanas (Figura 22) en las plantas de los tratamientos (SF y CF) permitió encontrar una relación directa entre la cantidad de ADN de *P. fijiensis* y la infección (%) cuatro semanas después del muestreo, así como diferencias significativas entre los tratamientos por el efecto de la aplicación de fungicidas (protectantes y sistémicos) sobre el patógeno y el efecto directo de las condiciones climáticas (precipitación) sobre la evolución de los síntomas de la enfermedad.

Relacionado a lo anterior, en un estudio realizado por Quirós y Guzmán (2010) en fincas bananeras de la zona Atlántica de Costa Rica durante 9 semanas cuantificaron la cantidad de ADN del patógeno, y encontraron diferencias significativas, donde el ADN de *P. fijiensis* (pg) fue muy superior en muestras de hojas posición 1 de áreas sin fungicidas (Finca La Rita) con respecto a las fincas tratadas con fungicidas (Las Juntas y Balatana). En muestras de hojas posición tres encontraron el mismo comportamiento (testigo>tratadas) y determinaron cantidades de ADN estadísticamente superiores a las cuantificadas en la hoja posición 1 y un efecto directo de las precipitaciones sobre la cantidad de ADN de *P. fijiensis*, sin embargo, no realizaron evaluaciones de la severidad de la enfermedad. Lo novedoso de los resultados obtenidos fueron las relaciones entre la cantidad de ADN del hongo y la infección (%).

Es claro que los resultados de ADN e infección se debieron al efecto de las precipitaciones (mm y horas), por ende la dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra es por influencia del clima y se ha determinado que altas precipitaciones (>100 mm), temperaturas entre 21,5 °C y 28 °C, humedades relativas superiores al 90 % son las idóneas para un acelerado desarrollo de la enfermedad (Stover 1980, Guzmán 2003, Marín *et al.* 2003, Martínez *et al.* 2011, Robinson y Galán 2012, Alarcón y Jiménez 2012, Álvarez *et al.* 2013), sin embargo, factores como duración de la lluvia, humedad foliar y unidades de calor tienen un efecto importante en la dinámica de la enfermedad en las extensas plantaciones.

En los resultados de este estudio se encontró una relación entre la cantidad de ADN de *P. fijiensis* y la infección (4 SDM), entendiéndose infección como el área foliar afectada (%), así como los síntomas de severidad de la enfermedad en el tratamiento sin aplicación de fungicida y mientras en plantas donde se aplicaron los fungicidas se observó el efecto del mismo sobre la cantidad de ADN del hongo y síntomas de la enfermedad Sigatoka Negra.



## 2.7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que:

La parte distal derecha de las hojas presentan las severidades mayores, lo que indica una mayor concentración de infecciones exitosas por parte de las ascosporas ya que en el estado candela se expone el lado derecho de la hoja (envés), que presenta a su vez una alta densidad de estomas y las condiciones ambientales durante la apertura como hoja candela condicionan los procesos tempranos de infección de *P. fijiensis*. Por lo anterior, el tamaño de muestra foliar de la parte distal derecha (~10 cm<sup>2</sup>) funciona para la detección y cuantificación del ADN de *P. fijiensis* mediante la técnica de qPCR.

Las técnicas de PCR utilizadas (PCR convencional y qPCR) son altamente sensibles y los *primers* utilizados tuvieron una alta especificidad para la detección y cuantificación de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en muestras de hojas natural y artificialmente inoculadas. De igual forma, las curvas estándar determinadas presentaron valores de precisión altos en las cuantificaciones de ADN.

Se lograron realizar cuantificaciones del ADN de *P. fijiensis* en hojas posición 1 de la planta. De igual forma, es posible la cuantificación del patógeno (ADN) partir del estado 0.4 de hoja candela, sin embargo, podría resultar en un muestreo destructivo por el estado y forma de la hoja.

Las plantas de ambos tratamientos no presentaron diferencias significativas en las variables de crecimiento, indicando una homogeneidad en las plantas seleccionadas para la cuantificación del ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1.

Los resultados del monitoreo molecular temprano permitió observar una relación directa entre la cantidad de ADN del hongo y las infección (%) de la misma hoja (4 SDM), donde se evidencia el efecto significativo de la aplicación de fungicidas sobre el crecimiento del patógeno (ADN y síntomas), y de las condiciones ambientales que ocurrieron cuando la hoja evaluada estuvo en sus estados de hoja candela.

## 2.8. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos, se recomienda:

Realizar calibraciones de muestreo en diferentes épocas del año, así como en diferentes zonas bananeras del atlántico de Costa Rica.

Realizar el monitoreo molecular temprano a nivel de hoja 1 en el segundo semestre del año, así como, el mismo estudio en áreas de renovación y plantación comercial para cuantificación del inóculo en condiciones de aplicaciones frecuentes de fungicidas.

Realizar el monitoreo molecular temprano a nivel de hoja posición 1 para mapear las zonas que presentan altas y bajas severidades de la enfermedad Sigatoka Negra y que deberían correlacionar con niveles iniciales de infección (%).

Con la misma metodología de muestreo en la hoja 1 (~10 cm<sup>2</sup>), realizar estudios de cuantificación molecular (qPCR) en las zonas bananeras donde se han detectado cepas con diferentes niveles de patogenicidad.

Realizar estudios de cuantificación del ADN de *Pseudocercospora fijiensis* a nivel de parcelas de experimentación para monitorear el efecto temprano de los fungicidas sistémicos utilizados en la industria bananera.

Realizar estudios con otras técnicas cuantitativas de biología molecular rápidas y económicas como LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) y su comparación con el PCR cuantitativo (qPCR) para *Pseudocercospora fijiensis* en banano.

## 2.9. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, J; Jiménez, Y. 2012. Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (*Musa* spp): Medidas para la temporada invernal (en línea). ICA (Instituto Colombiana Agropecuario). Bogotá, COL. Consultado 28 abr. 2017. Disponible en <http://www.ica.gov.co/getattachment/08fbb48d-a985-4f96-9889-0e66a461aa8b/-nbsp;Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-platano.aspx>
- Álvarez, E; Pantoja, A; Gañan, L; Ceballos, G. 2013. Estado del arte y opciones de manejo del Moko y la Sigatoka Negra en América Latina y el Caribe. Cali, Colombia, CIAT, FAO. 40 p.
- Arzanlou, M; Abeln, ECA; Kema, GHJ; Waalwijk, C; Carlier, J; De Vries, I; Guzmán, M; Crous, PW. 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology* 97(9):1112-1118.
- Arzanlou, M; Kema, GHJ; Waalwijk, C; Carlier, J; De Vries, I; Guzmán, M; Araya, M; Helder, J; Crous, PW. 2009. Molecular diagnostics in the *Mycosphaerella* leaf spot disease complex of banana and for *Radophlus similis*. *Acta Hort* 828:237-243.
- Arias, F; Mata, R; Alvarado, A; Serrano, E; Laguna, J. 2010. Caracterización química y clasificación taxonómica de algunos suelos cultivados con banano en las llanuras aluviales del Caribe de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 34(2):177-195.
- Balint-Kurti, P; Churchill, ACL. 2004. Towards a molecular understanding of *Mycosphaerella*/banana interactions. Pag.147-160. *In* Banana improvement: Cellular, molecular biology, and induced mutations. Enfield, USA.
- Brun, J. 1963. Les cercosporiose du bananier aux Guineé. Etude de la phase ascosporeé du *Mycosphaerella musicola* Leach. These Doctor, Institut Francais de Recherches Fruitières de Outre Mer, Université de París.

- Castelan, FB; Saraiva, LA; Lange F; de Lapayre de Bellaire, L; Cordenunsi, BR; Chillet, M. 2012. Effects of Black Leaf Streak Disease and Sigatoka Disease on Fruit quality and maturation process of bananas produced in the subtropical conditions of southern Brazil. *Crop Protection* 35:127-131.
- Castelan, FB; Abadie, C; Hubert, O; Chilin-Charles, Y; de Lapayre de Bellaire, L; Chillet, M. 2013. Relation between the severity of Sigatoka disease and banana quality characterized by pomological traits and fruit green life. *Crop Protection* 50:61-65
- Cao, Y; Li, Y; Li, J; Wang, L; Cheng, Z; Wang, H; Fan, Z; Li, H. 2016. Rapid and quantitative detection of *Pythium inflatum* by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay. *Eur J Plant Pathol* 144:83-95.
- Conde-Ferrández, L; Grijalva-Arango, R; Canto-Canché, B; Manzo-Sánchez, G; Canul-Salazar, M; James, AC. 2010. The development of mating type-specific primers for *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka of banana, and analysis of the frequency of idiomorph types in Mexican populations. *Australian Plant Pathology* 39:217-225.
- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). 2011. Implementación de buenas prácticas agrícolas para reducir el escurrimiento de plaguicidas en el cultivo de banano de la región Caribe Costarricense (en línea). Consultado 13 mar. 2018. Disponible en <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-corbana/Estudio%20de%20caso%20Corbana.pdf>
- Cools, HJ; Hammond-Kosack, KE. 2013. Exploitation of genomics in fungicide research: current status and future perspectives. *Molecular Plant Pathology* 14(2):197-210.
- Chillet, M; Abadie, C; Hubert, O; Chilin-Charles, Y; de Lapeyre de Bellaire, L. 2009. Sigatoka disease reduces the greenlife of bananas. *Crop Protection* 28:41-45.

- Churchill, ACL. 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 12(4):307-328.
- Di Rienzo J; Casanoves F; Balzarini M; González L; Tablada M; Robledo C. 2018. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, AR. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz-Trujillo, C; Chong, P; Stergiopoulos, I; Cordovez, V; Guzmán, M; De Wit, PJGM; Meijer, HJG; Scalliet, G; Sierotzki, H; Peralta, EL; Arango, RE; Kema, GHJ. 2018. A new mechanism for reduced sensitivity to demethylation-inhibitor fungicides in the fungal banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. *Molecular Plant Pathology* 19(6):1941-1503.
- Escobar-Tovar, L; Magaña-Ortíz, D; Fernández, F; Guzmán-Quesada, M; Sandoval-Fernández, JA; Ortiz-Vázquez, E; Loske, AM; Gómez-Lim, MA. 2015. Efficient transformation of *Mycosphaerella fijiensis* by underwater shock waves. *Journal of Microbiological Methods* 119:98-105.
- Fouré, E; Ganry, J. 2008. A biological forecasting system to control Black Leaf Streak disease of bananas and plantains *Fruits* 63:311-317.
- García, N; Morales, JG; González, P; Gutiérrez, PA; Marín, M. 2013. Detección y cuantificación de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en plantas señuelo y cultivos de papa en Colombia mediante qPCR. *Acta biol. Colomb* 18(1):121-126.
- Garces, FF; Gutierrez, A; Hoy, JW. 2014. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. *Plant Disease*. 98(1):121-126.
- Gómez Ruíz, ML. 2013. Efecto de las condiciones de incubación y de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Tesis Lic. San Carlos, CR, TEC. 99 p.

- Guzmán, M. 2003. Epidemiología de la Sigatoka Negra y el sistema de preaviso biológico. Pag. 26-27. *In* Taller INIBAP, Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Guayaquil. Ecuador.
- Hidalgo, M; Tapia, A; Rodríguez, W; Serrano, E. 2006. Efecto de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery). *Agronomía Costarricense* 30(1):45-41.
- Hu, J; Johnson, EG; Wang, NY; Davoglio, T; Dewdney, M. 2014. qPCR quantification of pathogenic *Guignardia citricarpa* and non-pathogenic *G. mangiferae* in citrus. *Plant Disease* 1-49.
- Jiménez-Fernández, D; Montes-Borrego, M; Jiménez-Díaz, RA; Navas-Cortés, JA; Landa, BB. 2010. In plant and soli quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris* and evaluated of Fusarium wilt resistance in chickpea with a newly developed quantitative polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 101(2):250-262.
- Johanson, A; Jeger, MJ. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycol. Res* 97:670-674.
- Johanson, A; Crowhurst, RN; Rikkerink, EHA; Fullerton, RA; Templeton, MD. 1994. The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *Plant Pathology* 43:701-707.
- Lazo, JV; Muñoz, JA; Escalona, A. 2012. Evaluación experimental del clorotalonil en el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plantaciones de plátano (*Musa* spp. AAB). *Bioagro* 24(2):127-134.
- Leiva-Mora, M; Portal, O; Alvarado-Capo, Y; Acosta-Suárez, M; Cruz-Martín, M; Sánchez-García, C; Rojas, LE; Roque, B. 2013. Identificación molecular de aislados cubanos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Protección Vegetal*. 28(3):229-231.

- Luchi, N; Pepori, AL; Bartolini, P; Loos, R; Santini, A. 2018. Duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Caliciopsis pinea* and *Fusarium circinatum* in pine samples. *Appl Microbiol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9184-1>.
- Marín, DH; Romero, RA; Guzmán, M; Sutton, TB. 2003. Black Sigatoka: An increasing treat to banana cultivation. *Plant disease* 87 (3):208-222.
- Manzo-Sánchez, S; Guzmán-González, S; Rodríguez-García, CM, James, A; Orozco-Santos, M. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1):87-96.
- Martínez, I; Villalta, R; Soto, E; Murillo, G; Guzmán, M. 2011. Manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo de banano. *Hoja divulgativa* 2011 (2):1-2.
- Martínez Bolaños, L. 2012. Epidemiología y Manejo de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) del banano (*Musa* AAA). Tesis Doc. Texcoco, MX. 61p.
- Murillo Salas, JE. 2015. Efecto de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la eficacia biológica de fungicidas sistémicos utilizados contra la Sigatoka Negra. Tesis Lic. San Carlos, CR, TEC. 176p.
- Orozco-Santos, M; Orozco-Romero, J; Pérez-Zamora, O; Manzo-Sánchez, G; Farías-Larios, J; da Silva Moraes, W. 2008. Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka Negra en banano y plátano. *Rev. Tropical Plant Pathology* 33(3):189-196.
- Pérez-Vicente, L. 2009. Enfermedades de banano y plátano: Análisis retrospectivo y perspectivas. *Producción Agropecuaria* 2(1):11-18.
- Portal, O; Izquierdo, Y; De Vleeschauwer, D; Sánchez-Rodríguez, A; Mendoza-Rodríguez, M; Acosta-Suárez, M; Ocaña, B; Jiménez, E; Höfte, M. 2011. Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*-banana interaction. *Plant Cell Rep* 30:913-928.

- Quirós, O. 2005. Extracción de ADN de banano para su utilización en estudios de biología molecular. Pag.128-129. *In* Informe anual 2005. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Quirós, O; Guzmán, M. 2008. Establecimiento de una metodología para la identificación de *Mycosphaerella fijiensis* y *Mycosphaerella musicola* y para la extracción de ADN de ambos patógenos de tejido foliar infectado. Pag.183-185. *In* Informe anual 2007. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Quirós, O; Aguilar, X; Guzmán, M. 2008. Optimización de un método de cultivo in vitro de *Mycosphaerella fijiensis* para la extracción de su ADN genómico en estudios moleculares. Pag.186-190. *In* Informe anual 2007. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Quirós, O; Guzmán, M. 2009a. Ajuste y estandarización del PCR en Tiempo Real (RT-PCR) para la detección y cuantificación de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra en banano. Pag.267-268. *In* Informe anual 2008. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- \_\_\_\_\_.2009b. Comparación de dos protocolos de extracción de ADN para ser utilizados en el análisis de PCR en tiempo real (RT-PCR) para la detección y cuantificación de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra en banano. Pag.269-275. *In* Informe anual 2008. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Quirós, O; Guzmán, M. 2010. Cuantificación de ADN de *Mycosphaerella fijiensis* en ascosporas y en hojas de banano asintomáticas, mediante PCR en tiempo real: bases para el desarrollo del monitoreo molecular. Pag.189-195. *In* Informe anual 2009. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.



- Quirós, O; Araya, M. 2010. Desarrollo de un protocolo para la cuantificación de ADN de *Radopholus similis* mediante PCR en tiempo real. Pag. 191-196. In Informe anual 2010. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Rodríguez-Gaviria, P; Cayón, G. 2008. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana* 26(2):256-265.
- Robinson, JC; Galán, V. 2012. Bananos y plátanos. Madrid, ESP. Ediciones Mandí-Prensa. 321 p.
- Romero, M; Díaz, T; Castañeda, D; Arango, R. sf. Diagnostico por PCR del complejo Sigatoka Negra en Colombia.
- Sánchez-García, C; Alvarado-Capó, Y; Acosta-Suárez, M; Leiva-Mora, M; Cruz-Martín, M; Roque, B. 2013. Cuantificación de fenoles en lesiones causadas por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en 'Cavendish naine'. *Revista Protección Vegetal* 28(2):149-152.
- Saville, A; Charles, M; Chavan, S; Muñoz, M; Gómez-Alpizar, L; Ristaino, JB. 2017. Population structure of *Pseudocercospora fijiensis* in Costa Rica reveals shared haplotype diversity with southeast Asian populations. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0047-R>
- Soto, M. 2014. Bananos: Conceptos básicos. Cartago, CR. Tecnológico de Costa Rica. 338 p.
- Stover, RH. 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantains. *Plant Disease* 64:750-756.
- Stergiopoulos, I; Cordovez, V; Ökmen, B; Beenen, HG; Kema, GHJ; De Wit, PJGM. 2014. Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology* 15(5):447-460.

- Temple, TN; du Toit, LJ; Derie, ML; Johnson, KB. 2013. Quantitative molecular diagnostics of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in carrot seed before and after hot-water treatment. *Plant Disease* 97(12):1585-1592.
- Tomlinson, JA; Dickinson, MJ; Boonham, N. 2010. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Applied Microbiology* 51:650-657.
- Vázquez-Euán, R; Martínez Bolaños, L; Tzec-Simá, M; Garrido-Ramirez, E. 2012. Presencia de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra, en desechos vegetales en las plantaciones. Pag. 7-20. *In* Innovaciones para el manejo integrado en campo de la Sigatoka Negra en México. Aportaciones a la investigación básica. Yucatán, México.
- Wen, K; Seguin, P; St-Arnaud, M; Jabaji-Hare, S. 2005. Real-time quantitative RT-PCR of defense-associated gene transcripts of *Rhizoctonia solani*-infected bean seedlings in response to inoculation with a nonpathogenic binucleate *Rhizoctonia* isolate. *Phytopathology* 95(4):345-353.
- Zandjanakou-Tachin, M; Vroh-Bi, I; Ojiambo, PS; Tenkouano, A; Gumedzoe, YM; Bandyopadhyay, R. 2009. Identification and genetic diversity *Mycosphaerella* species on banana and plantain in Nigeria. *Plant Pathology* 58:536-546.
- Zahn, M; Teuber, F; Bollig, K; Johannes, H. 2011. Quantification of *Pseudocercospora fuligena* in tomato lines carrying introgressions from *Solanum habrochaites* using a qPCR assay. *Plant Disease* 95(4):394-400.
- Zandjanakou-Tachin, M; Vroh-Bi, I; Ojiambo, PS; Tenkouano, A; Gumedzoe, YM; Bandyopadhyay, R. 2013. Pathogenic variation of *Mycosphaerella* species infecting banana and plantain in Nigeria. *Plant Pathology* 62:298-308.
- Zhang, X; Zhang, H; Pu, J; Qi, Y; Yu, Q; Xie, Y; Peng, J. 2013. Development of a Real-Time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* tropical race 4 in soil. *Plos One* 8(12):1-10.

# **CAPÍTULO III. Determinación de la relación entre factores climáticos, cantidad de ADN y la infección foliar de Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*) en plantas de banano (*Musa AAA*)**

## **3.1. RESUMEN**

La presente etapa de la investigación se llevó a cabo con el objetivo de determinar el efecto de los factores climáticos sobre la cantidad de ADN de *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano y en la infección (% de área necrosada) en las hojas de la planta de banano, evaluadas durante 16 semanas consecutivas (semana 8 a la 23 del 2018). Se determinó que las condiciones climáticas imperantes durante que la hoja estuvo en estado de candela fueron las que influyeron en el crecimiento del patógeno (pg ADN) y el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, evaluadas mediante el porcentaje de área foliar necrosada (infección). En los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas las variables climáticas de mayor relación ( $R^2$ ) con la cantidad de ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1 fueron la precipitación (0,45 y 0,54), temperatura promedio (0,54 y 0,17), humedad relativa (0,43 y 0,38) y radiación solar (0,34 y 0,52). También se determinó que las aplicaciones de fungicidas tuvieron un efecto significativo sobre la cantidad de ADN del patógeno y consecuentemente sobre la variable infección; por ende, afectó el desarrollo de los síntomas de Sigatoka Negra. Se determinó en el tratamiento sin fungicidas la relación ( $R^2$ ) entre la variable infección (%) y la cantidad de ADN del hongo (0,45), y las condiciones climáticas de precipitación (0,40), temperatura mínima (0,45), temperatura promedio (0,28), humedad relativa (0,58), humedad foliar (0,40) y radiación solar (0,60). Se observó que la aplicación de fungicidas afectó la relación clima-infección y clima-ADN del hongo, por su efecto sobre el proceso de infección del patógeno *P. fijiensis*.

**Palabras clave:** Sigatoka Negra, factores climáticos, cantidad de ADN, infección foliar.

### 3.2. ABSTRACT

The present stage of the investigation was carried out with the objective of determining the effect of climatic factors on the amount of DNA of *Pseudocercospora fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka disease in banana plants and infection (% of necrosed area) ) on the leaves of the banana plant, evaluated for 16 consecutive weeks. It was determined that the climatic conditions in which the cigar leaf developed were influential in the growth of the pathogen (pg DNA) and the development of the symptoms, (evaluated by the percentage of necrotic leaf area). In the treatments with and without application of fungicides, the weather variables with the highest correlation ( $R^2$ ) with the amount of *P. fijiensis* DNA in leaf position 1 were precipitation (0.45 and 0.54), average temperature (0.54 and 0.17), relative humidity (0.43 and 0.38) and solar radiation (0.34 and 0.52). It was also determined that the applications of fungicides had a significant effect in the amount of DNA of the pathogen and consequently in the development of Black Sigatoka symptoms. The correlation ( $R^2$ ) between the infection variable (%) and the amount of DNA of the fungus (0.45), and the climatic conditions of precipitation (0.40), minimum temperature (0.45), average temperature (0.28), relative humidity (0.58), leaf moisture (0.40) and solar radiation (0.60), were measured for the treatments without fungicides. It was observed that the application of fungicides affected the climate-infection and climate-DNA relationship of the fungus, due to its effect on the infection process of the pathogen *P. fijiensis*.

**Key words:** Black Sigatoka, climatic factors, amount of DNA, foliar infection.

### 3.3. INTRODUCCIÓN

La zona del Caribe de Costa Rica tiene condiciones climáticas idóneas para el desarrollo de la enfermedad Sigatoka Negra (Robinson y Galán 2012). Las variedades del sub-grupo Cavendish son altamente susceptibles y al mismo tiempo presentan excelentes parámetros de productividad; por ende, la aplicación frecuente de fungicidas es una de las principales herramientas en el control integrado de Sigatoka Negra en las plantaciones de banano (Manzo *et al.* 2005, Lazo *et al.* 2012). En ausencia del combate químico, la enfermedad causa pérdidas mayores al 50 %; comprometiendo la tasa de fotosíntesis, respiración y transporte de asimilados, lo que puede retrasar la floración, la cosecha y reduce la vida verde de la fruta (Hidalgo *et al.* 2006, Martínez *et al.* 2011).

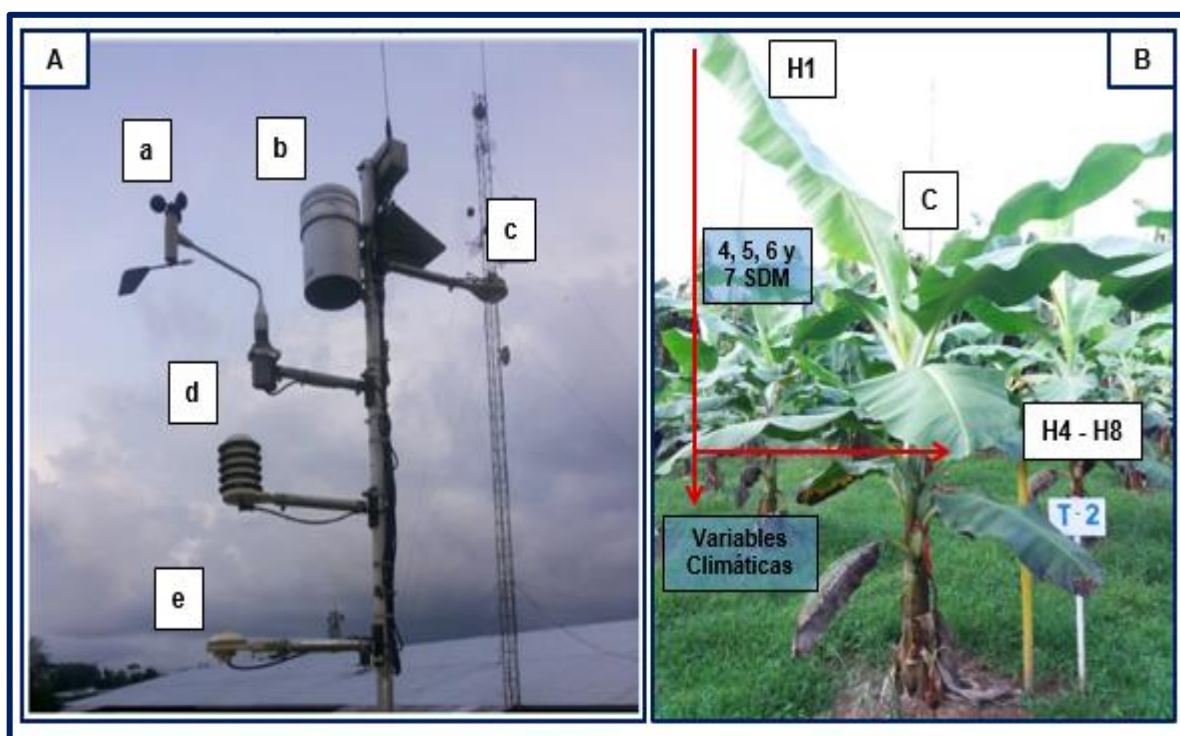
Los estudios de epidemiología de la enfermedad Sigatoka Negra (Gauhl 1994, Romero 1996, Jácome 2003, Martínez 2012) son la base para entender la dinámica de la misma y realizar un manejo eficiente y estratégico de forma integrada incluyendo el uso de fungicidas. Debido en los cambios de los patrones climáticos, es necesario determinar si la dinámica de la Sigatoka Negra ha cambiado en respuesta al clima semana a semana y establecer nuevamente correlaciones entre variables relacionadas con el proceso de infección y desarrollo de los síntomas con las variables climáticas.

La enfermedad inicia con la dispersión de ascosporas y su disposición sobre la superficie abaxial de las hojas candela (Hidalgo *et al.* 2006, Viljoen *et al.* 2017), luego viene el proceso de infección (germinación, penetración y colonización del tejido), bajo condiciones climáticas óptimas, como temperatura óptima promedio de 27 °C, y periodos considerables de alta humedad sobre el tejido foliar (Bornacelly 2009). Sin embargo, estos procesos llegan a reducirse al 50 % con temperaturas menores a 20 °C (Robinson y Galán 2012). Ante lo anterior, el objetivo de este Capítulo es relacionar los factores climáticos, el ADN del patógeno y la infección (%) de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano con y sin aplicación de fungicidas.

### 3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.4.1. Descripción de la investigación

Esta etapa de la investigación consistió en relacionar las variables climáticas con la infección (% área foliar afectada), utilizando los datos obtenidos en todo el periodo de evaluación del experimento desde febrero a julio del 2018, en plantas de los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas (T2 y T1). Los datos de las variables climáticas fueron obtenidos de la estación agroclimatológica ubicada a 800 m del experimento y a una altura mayor a 3 m (altura del cultivo), como se ilustra en la Figura 24A.



**Figura 24.** (A) Estación agroclimatológica marca ADCON<sup>®</sup>, ubicada en Río Frío, Sarapiquí. Sensores: **a**= Velocidad y dirección del viento; **b**= Pluviómetro; **c**= Radiación solar; **d**=Temperatura y humedad relativa; **e**= Humedad foliar. (B) Esquema de la relación entre las variables climáticas y la severidad en las hojas de la planta. **C**= Hoja candela; **H1**= Hoja 1; **H4-H8**= Rango de posición de la hoja durante 4, 5, 6 y 7 semanas de evaluación. **SDM**= Semanas después de muestreo. Río Frío, 2018.

### 3.4.2. Variables de estudio

Las variables estudiadas se detallan en el Cuadro 11:

**Cuadro 11.** Descripción de las variables contempladas en la relación con la infección de Sigatoka Negra (*P. fijiensis*). Río Frío, 2018.

Variables de Estudio	Descripción	Abreviatura
Infección 4 SDM (%)		S 4 SDM (%)
Infección 5 SDM (%)	Evaluación visual del área de hoja necrosada (%)	S 5 SDM (%)
Infección 6 SDM (%)		S 6 SDM (%)
Infección 7 SDM (%)		S 7 SDM (%)
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log(10)*	Muestreo foliar de la hoja 1	ADN H1
Área de hoja evaluada (25 %)*	Área de evaluación visual de la Infección (longitud)	AHE
Altura (cm)*	Valor promedio semanal de las variables de crecimiento	A (cm)
Circunferencia (cm)*		C (cm)
Hojas totales*		HT
Temperatura promedio máxima (°C)**	Valor promedio por semana	Tp Máx (°C)
Temperatura promedio mínima (°C)**		Tp Mín (°C)
Temperatura máxima (°C)**		T Máx (°C)
Temperatura mínima (°C)**		T Mín (°C)
Temperatura promedio (°C)**		T Promedio (°C)
Humedad relativa (%)**		HR (%)
Precipitación (mm)**		P (mm)
Precipitación (horas)**		P (h)
Temperatura máxima óptima (horas)***		T Máx Ópt (h)
Temperatura mínima óptima (horas)***		T Mín Ópt (h)
Temperatura alta (horas)**	T Alta (h)	
Temperatura baja (horas)**	T baja (h)	
Temperatura óptima (horas)**	T Ópt (h)	
Humedad relativa >90 % (horas)***	Valor acumulado por semana	HR>90% (h)
Humedad foliar (mm)**		HF (mm)
Humedad foliar (horas)**		HF (h)
Luz (horas)**		Luz (h)
Unidad de calor (°C)**		UC (°C)
Radiación solar (W m <sup>-2</sup> )**		Rs (W m <sup>-2</sup> )

\* = Variables recolectadas durante el muestreo temprano de la hoja 1; 4 semanas antes de la evaluación de infección (%).

\*\* = Condiciones climáticas dadas durante el desarrollo de la hoja candela; una semana antes del muestreo foliar y 5 semanas antes de la evaluación de infección (%).

\*\*\* = Condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad, temperaturas de 25 °C a 28 °C y humedad relativa mayor al 90 %.

Las variables de crecimiento y concentración de ADN del patógeno correspondieron al promedio de la semana cuando se realizó el muestreo de la hoja 1, las variables climáticas de mayor relación fueron las imperantes en el momento del desarrollo de la hoja candela; una semana antes del muestreo de la hoja 1, esto se determinó mediante curvas de relación entre las variables, la relación entre variables en la primera, segunda y tercera SDM (Semanas Después de Muestreo) disminuyó en cada semana.

En la estación agroclimatológica se registraron semanalmente las variables de clima promediadas y acumuladas; para obtener las temperaturas máximas y mínimas se calculó las horas en que la temperatura estuvo en un ámbito de 25 °C a 28 °C, lo mismo para cuando la humedad relativa fue mayor a 90 %. Para el cálculo de las Unidades de Calor (UC) se utilizó la fórmula de Robinson (1996), reportada por Soto y Guzmán (2011).

### 3.4.3. Diseño experimental

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

En donde:

$\mu$  = media general

$T_i$  = efecto del *i*-ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental o aleatorio

### 3.4.3. Análisis de datos

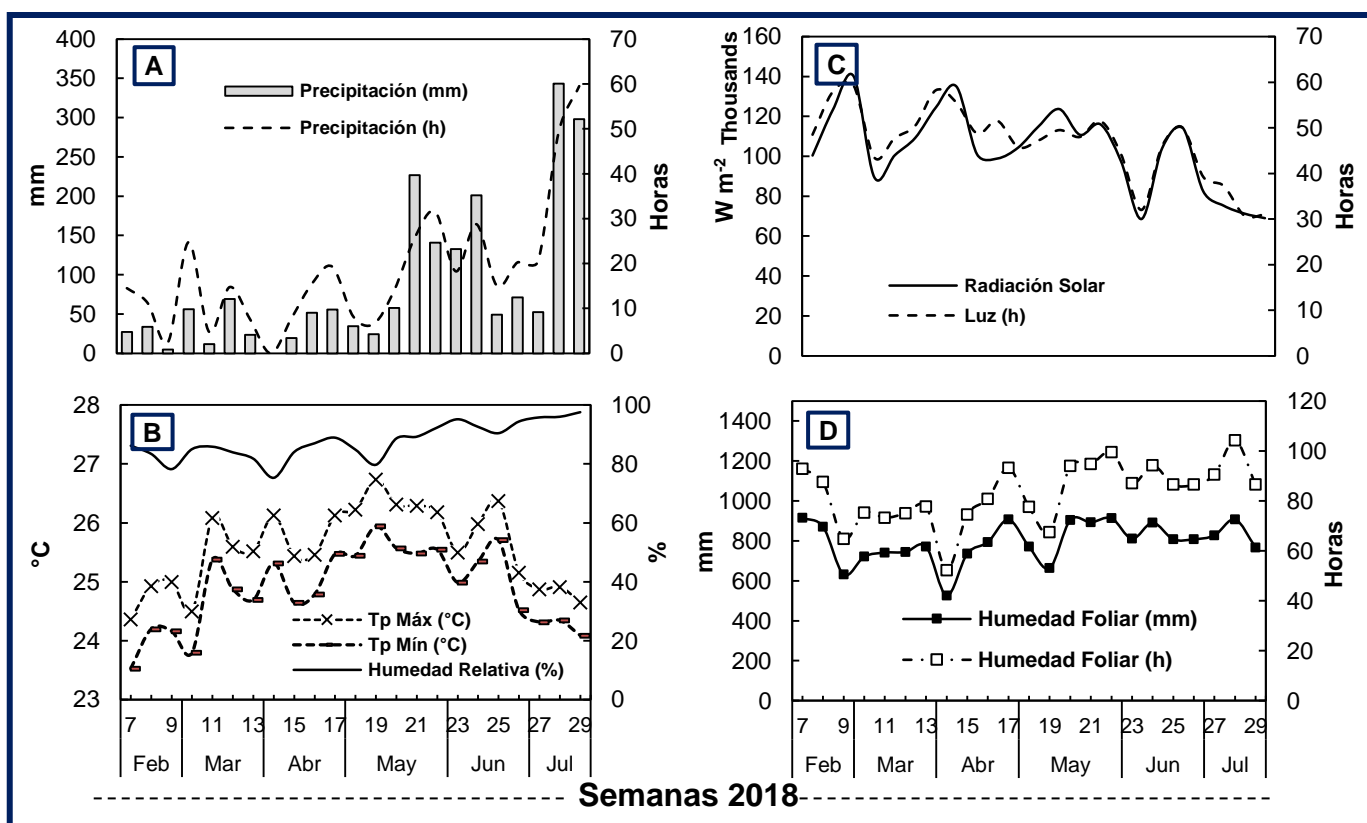
Se realizó el análisis estadístico para determinar diferencias significativas entre las variables de los tratamientos en cada semana por medio de modelos lineales generales y mixtos (MLMix). La heteroscedasticidad se corrigió con la función *varIdent*:  $g(d) = d$ . Se determinaron diferencias significativas mediante el uso de comparación múltiple de LSD Fisher con un nivel de significancia del 5 % ( $p=0,05$ ). Además, se realizaron curvas de regresión (lineal y no lineal) y se determinó  $R^2$ . Los análisis se realizaron con el paquete estadístico InfoStat/P (Di Rienzo *et al.* 2018).



### 3.5. RESULTADOS

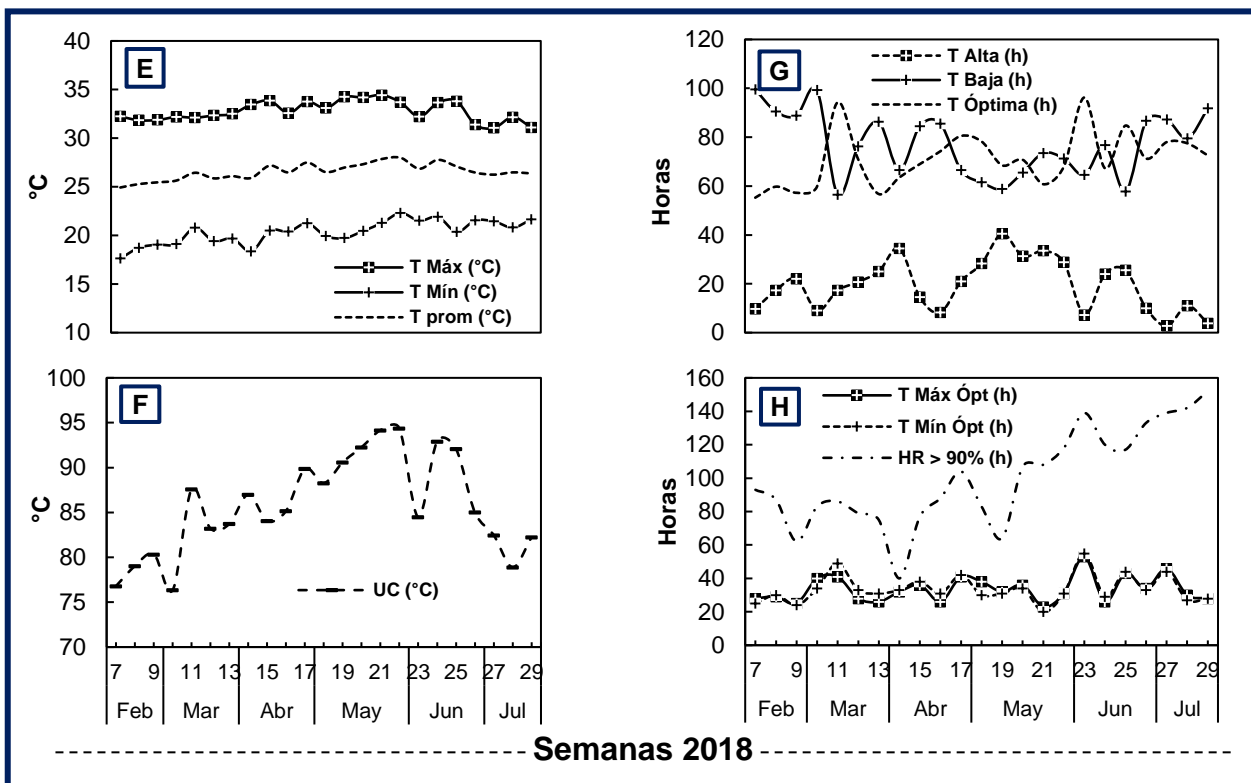
#### 3.4.5.1. Condiciones climáticas del experimento

En la Figura 25 se resumen las condiciones climáticas que ocurrieron durante el desarrollo del experimento en los meses de febrero a julio. Durante ese periodo de tiempo se registraron precipitaciones semanales desde 0 mm hasta 345 mm (Figura 25A), con temperaturas promedio máxima y mínimas por encima de los 23 °C (Figura 25B y 25E) y humedad relativa promedio mayores al 75 %. Las condiciones de radiación solar y horas luz presentan variaciones semanales (Figura 25C), por el efecto de las precipitaciones y nubosidad. Las variables de humedad foliar, duración de las temperaturas y humedad relativa favorables para el desarrollo de la Sigatoka Negra se muestran en las Figuras 25C, 25G y 25H.



**Figura 25.** Condiciones climáticas registradas desde febrero a julio del 2018. Río Frío, 2018.

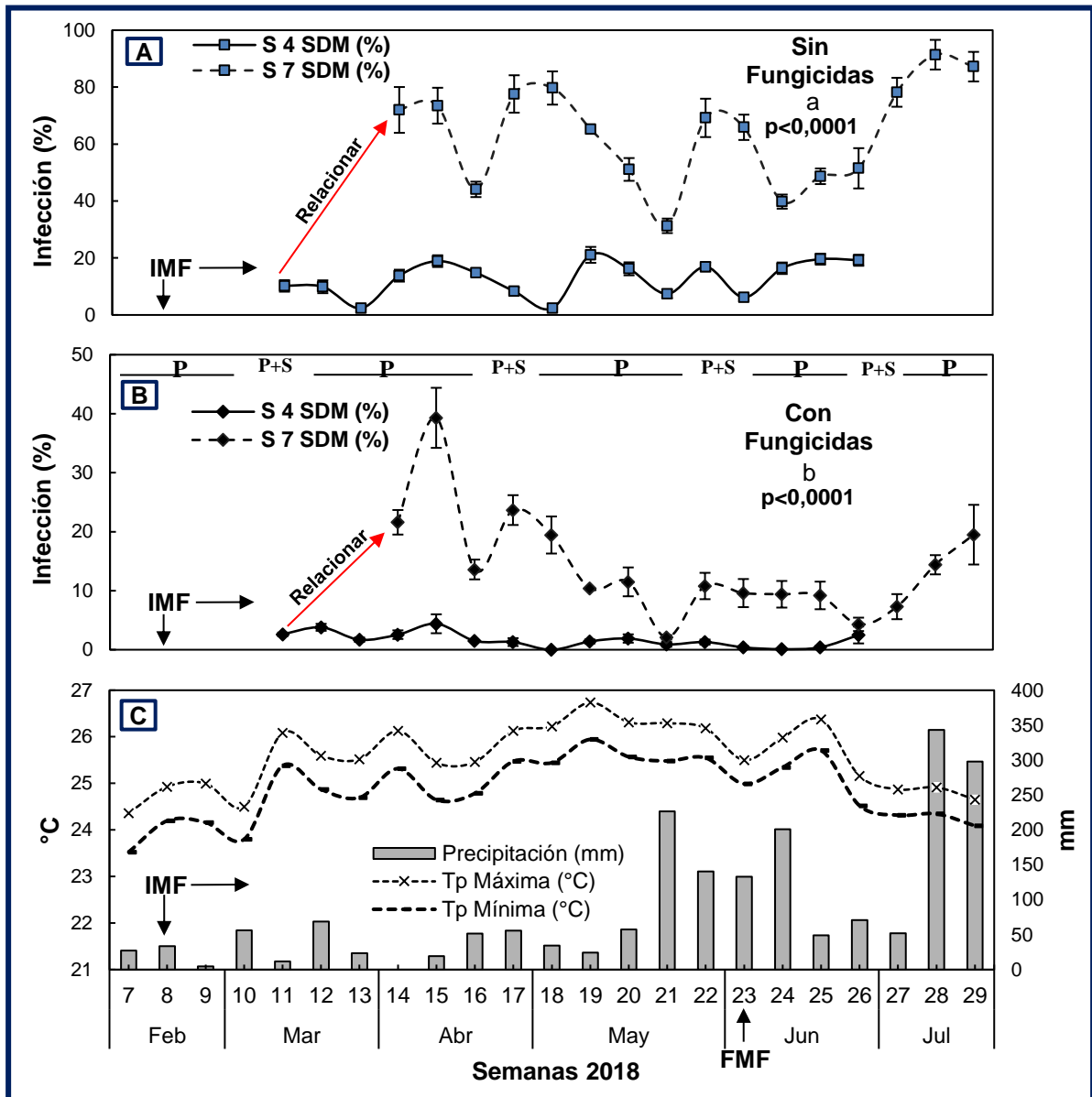
Continua en la siguiente página



**Figura 25.** Condiciones climáticas registradas desde febrero a julio del 2018. Río Frío, 2018.

### 3.4.5.2. Relación entre la infección de Sigatoka Negra (SN), ADN de *P. fijiensis* y las condiciones climáticas

En las Figuras 26A y 26B se observa gráficamente la relación directa entre la infección de hojas evaluadas a la cuarta y séptima semana después del muestreo foliar (SDM) de plantas de los tratamientos sin fungicidas (SF) y con fungicidas (CF). Para el tratamiento SF (Figura 26A) las infecciones semanales de 4 SDM presentaron variaciones entre 2 % y 25 % de área necrosada; y se incrementó a 7 SDM alcanzando necrosis de la hoja entre 30 % y hasta 80 % en algunas semanas. Paralelamente, se encontró un efecto significativo del fungicida sobre las infecciones de la hoja a 4 SDM (<5 %) y la 7 SDM (5 %-40 %); como se ilustra en la Figura 26B. Sin embargo, la relación directa entre las variables se mantiene a pesar del efecto de los fungicidas sobre el desarrollo de la enfermedad Sigatoka Negra ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 26.** Relación entre el avance de la infección (4 a 7 SDM) de Sigatoka Negra en las hojas del monitoreo molecular temprano y las condiciones climáticas de precipitación y temperaturas presentes durante el desarrollo del estudio. **SDM**= Semanas Después de Muestreo **IMF**= Inicio del Muestreo Foliar; **FMF**= Finalización del Muestreo Foliar. Programa de aplicación de fungicidas: **P**= Fungicidas Protectantes; **S**= Fungicidas Sistémicos. Río Frío, 2018.

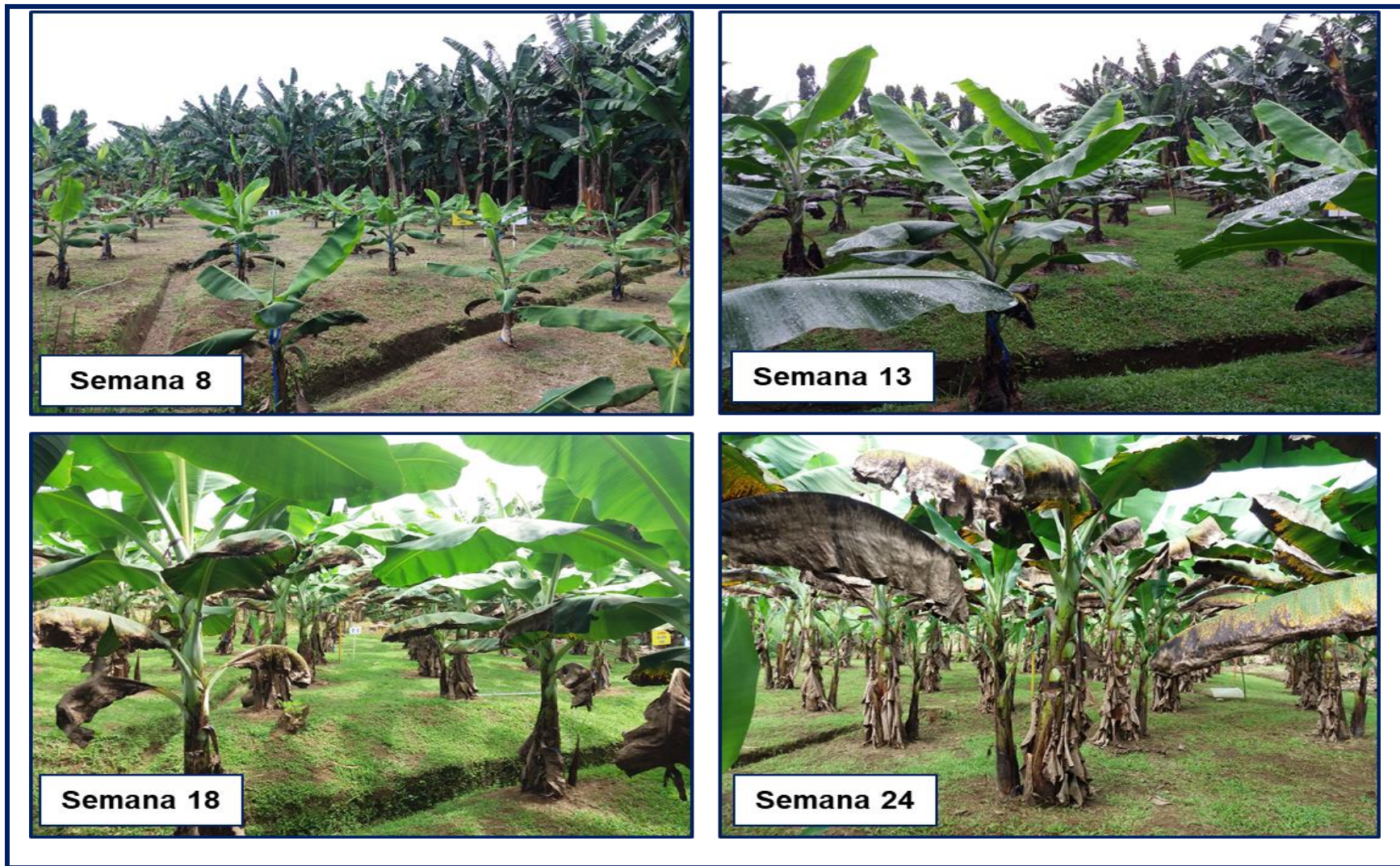
Las variaciones en el tiempo (semanas) del área necrosada (% de infección) se debieron al efecto del muestreo de hojas número uno diferentes y las condiciones climáticas (precipitación y temperaturas) cuando cada hoja estuvo en estado de candela (Figura 26C), tal y como se explicó en el Capítulo II.

En la Figura 27 se ilustra la evolución de los síntomas en las plantas del tratamiento sin aplicación de fungicidas, desde semana 8 hasta la semana 24 del 2018, se observó una menor cantidad de hojas verdes por el efecto de Sigatoka Negra. En la Figura 28 se detallan las asociaciones entre las variables climáticas y la infección (% área necrosada 4 SDM) de Sigatoka Negra (SN) en las hojas número uno evaluadas del tratamiento sin aplicación de fungicidas (T1), desde la semana 8 hasta la 26 del 2018. En la Figura 28A se observa la relación entre las cantidades de ADN (pg) de *P. fijiensis* en hojas posición 1 y la infección a 4 SDM ( $R^2=0,45$ ), con una tendencia de crecimiento de la infección en función del ADN del patógeno determinado de forma temprana mediante la técnica qPCR en hojas número uno de las diferentes semanas.

Por otro lado, se observaron relaciones aceptables ( $R^2>0,30$ ) entre la infección (4 SDM) y las variables de clima que ocurrieron durante la semana del desarrollo de la hoja candela (antes del muestreo de hoja 1), precipitación en mm ( $R^2=0,31$ ) y horas de lluvia ( $R^2=0,39$ ), la temperatura mínima ( $R^2=0,45$ ), temperatura promedio ( $R^2=0,28$ ), humedad relativa ( $R^2=0,57$ ), humedad relativa mayor al 90 % ( $R^2=0,44$ ) y la humedad foliar ( $R^2=0,40$ ) presentaron regresiones no lineales de mejor ajuste con tendencias crecientes de la infección en función de dichas variables climáticas (Figura 28B - 28I). La única excepción fue la radiación solar, donde las infecciones disminuyeron en las semanas de mayor radiación solar ( $R^2=0,59$ ).

En la Figura 29 se ilustra el desarrollo de las plantas y el efecto de los fungicidas (T2) sobre la infección de la enfermedad Sigatoka Negra (SN). Se observaron en el tratamiento CF plantas con un menor número de hojas dañadas, lo que se traduce en una mayor cantidad de hojas fotosintéticamente activas. Relacionado a lo anterior, en la Figura 30 (A - I) se relacionaron las variables climáticas y la infección de Sigatoka Negra determinadas en las hojas de muestreo semanal y con base en estos resultados se encontró un efecto significativo por la aplicación de fungicidas, afectando las correlaciones entre las variables estudiadas.





**Figura 27.** Estado de las plantas del tratamiento sin aplicación de fungicidas (T1) desde febrero a julio del 2018. Río Frío, 2018.

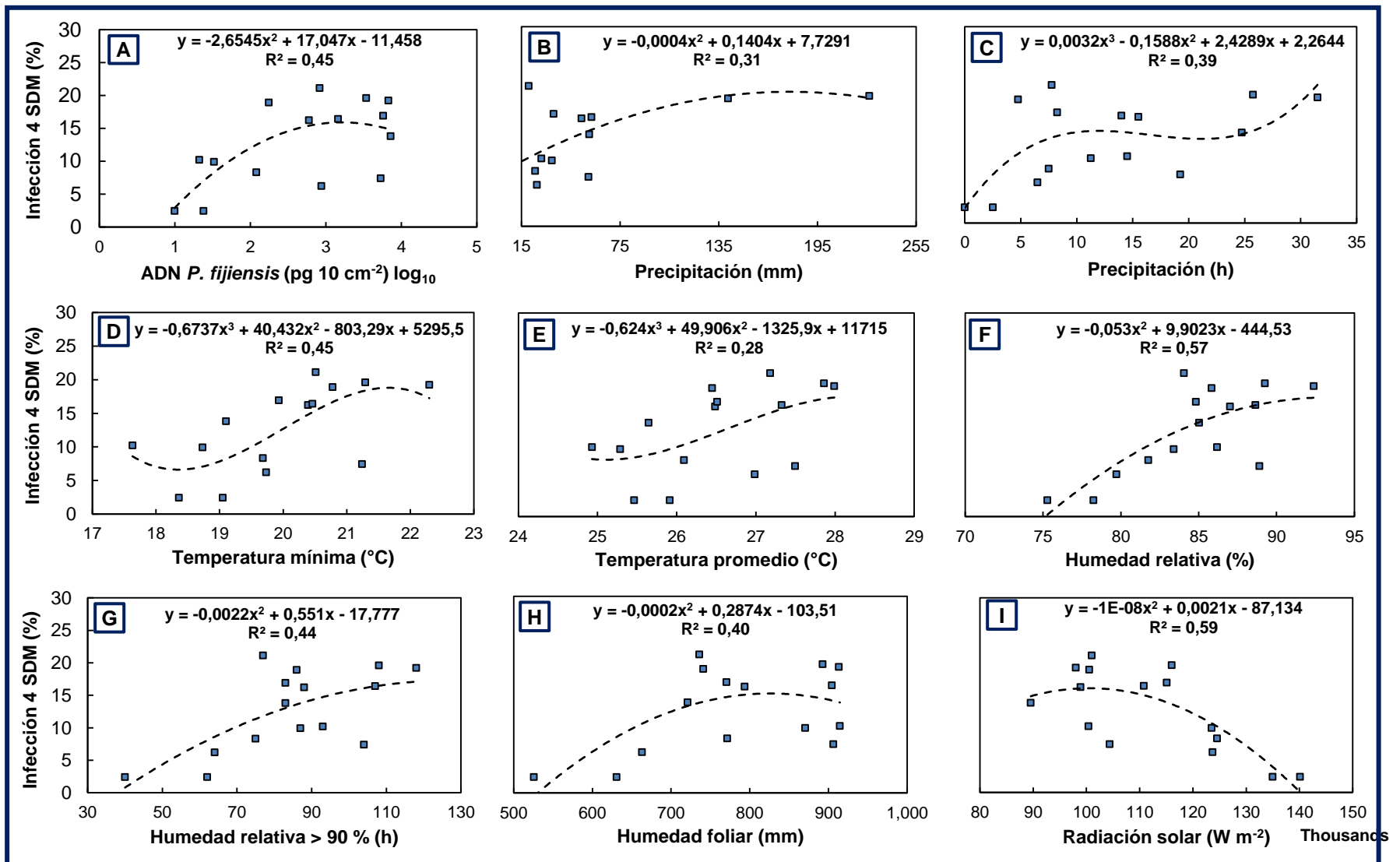
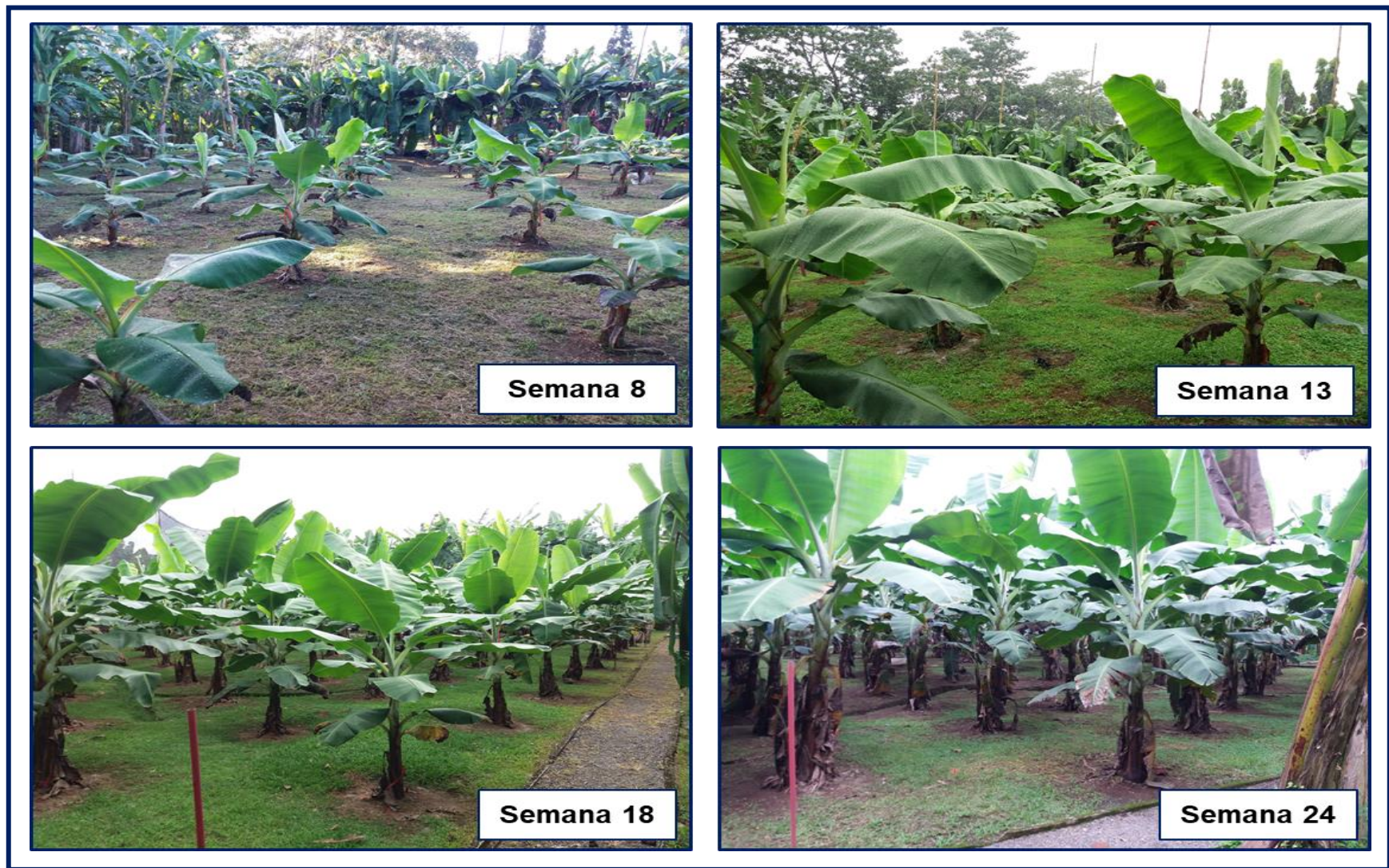
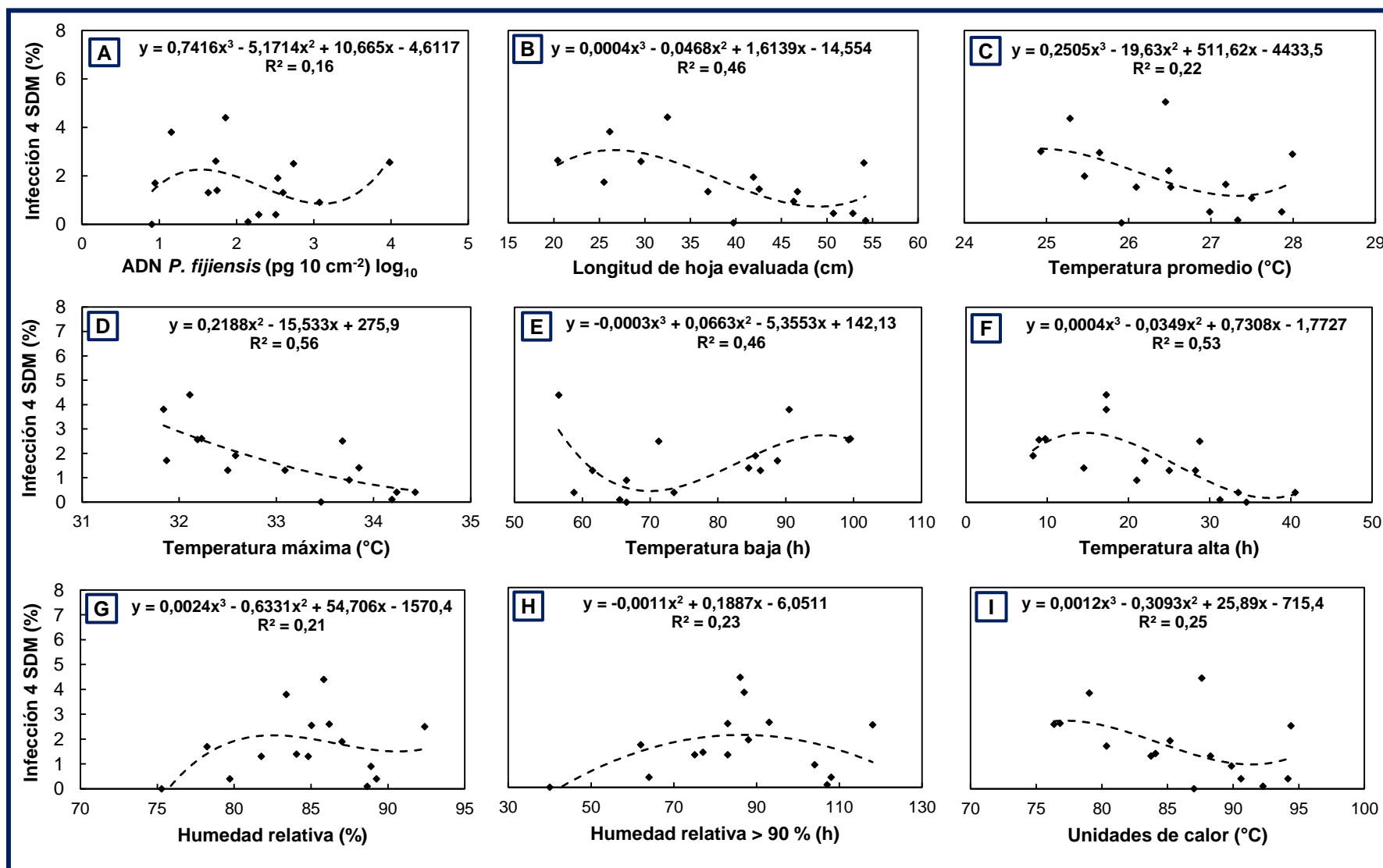


Figura 28. Relación entre clima, ADN de *P. fijiensis* y la infección (4 SDM) de SN en plantas sin fungicidas. Río Frío, 2018.





**Figura 29.** Estado de las plantas del tratamiento con aplicación de fungicidas (T2) desde febrero a julio del 2018. Río Frío, 2018.



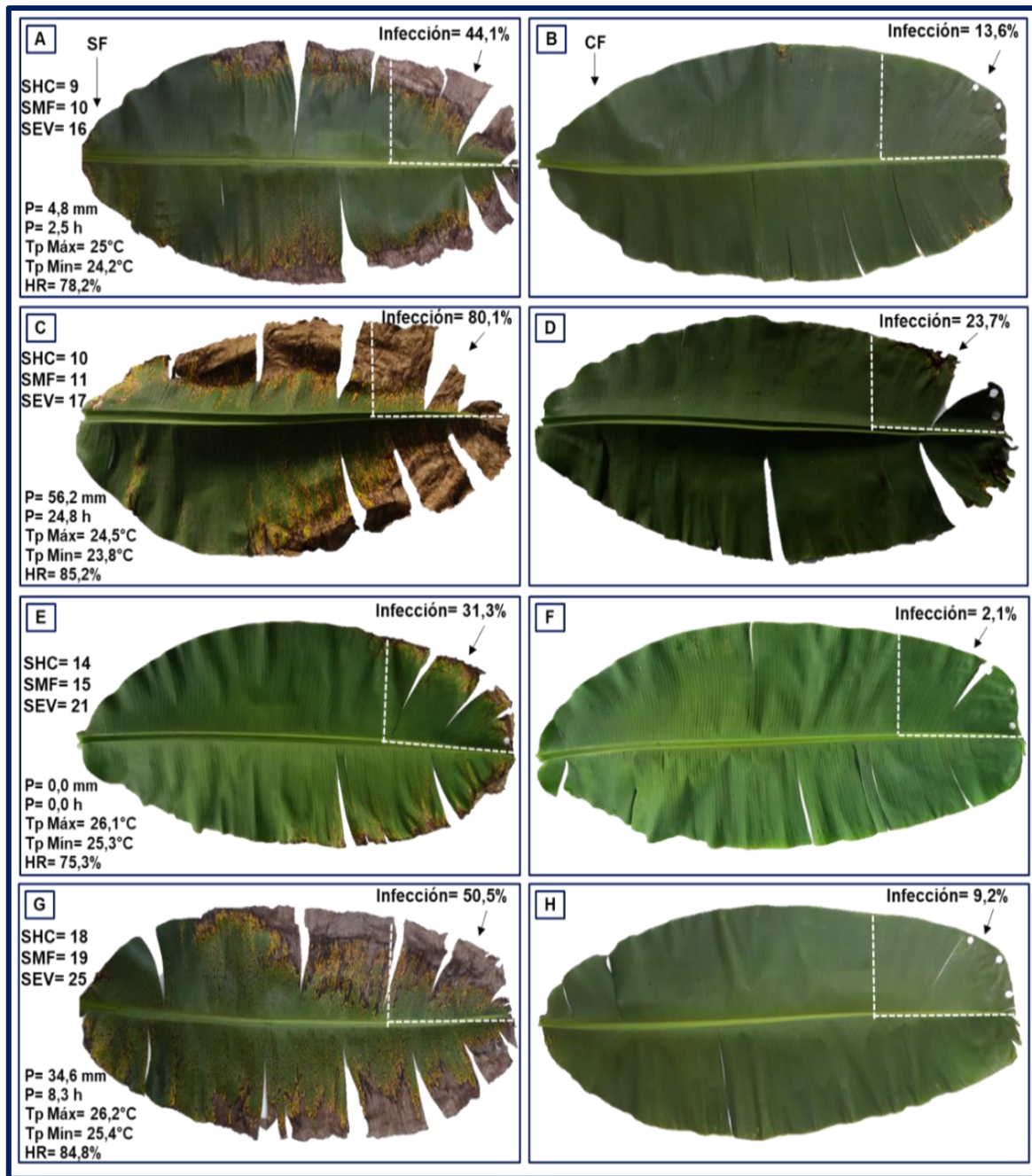
**Figura 30.** Relación entre clima, ADN de *P. fijiensis* y la infección (4 SDM) de SN en plantas con fungicidas. Río Frío, 2018.



Por su parte, el uso de fungicidas afectó las relaciones entre el clima y la infección (%), donde las variables con relaciones aceptables fueron: ADN (pg) de *P. fijiensis* ( $R^2=0,16$ ), área de hoja evaluada ( $R^2=0,46$ ), temperatura promedio ( $R^2=0,22$ ), temperatura máxima ( $R^2=0,56$ ), temperatura baja ( $R^2=0,46$ ), temperatura alta ( $R^2=0,53$ ), humedad relativa ( $R^2=0,21$ ), humedad relativa mayor al 90 % ( $R^2=0,22$ ) y las unidades de calor ( $R^2=0,25$ ).

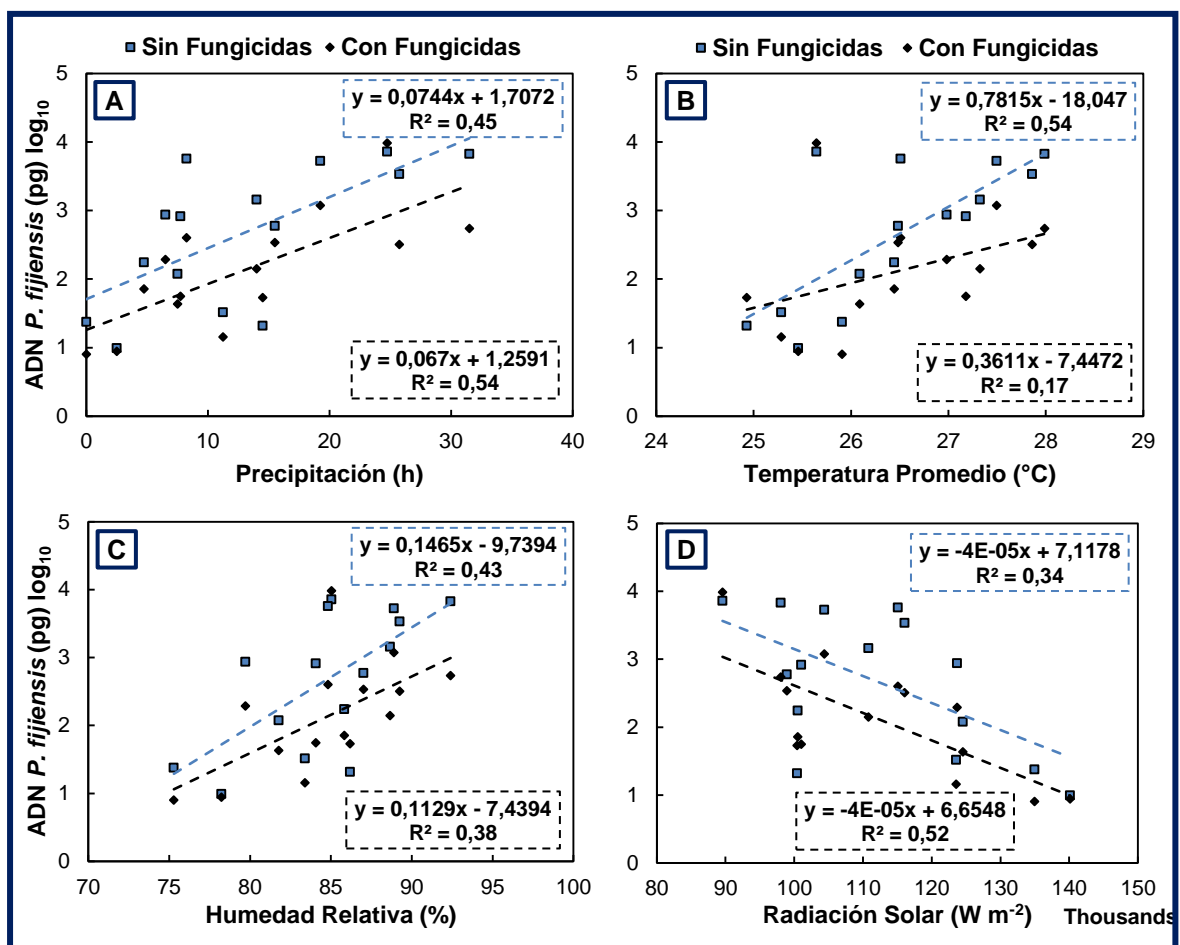
Por lo anterior, en la Figura 31 se demuestra visualmente el efecto del clima sobre la infección (%) a la 7 SDM (última evaluación visual). Información adicional que aparece en dicha figura se refiere a las semanas de hoja candela, muestreo foliar y evaluación final, así como los valores de las variables de precipitación (mm y horas), temperatura (máxima y mínima) y la humedad relativa, para los tratamientos sin aplicación de fungicidas (SF) y con aplicación de fungicidas (CF). Se observó el efecto de la protección (<infección) durante siete semanas de las aplicaciones de los fungicidas que recibió esa hoja para el combate de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano.

En los anteriores resultados, se evidenció las relaciones directas entre las variables de clima y la variable del porcentaje de área foliar necrosada (infección), así como las relaciones entre la cantidad de ADN del hongo y la posterior infección (%) en la misma hoja evaluada. No obstante, también se encontraron asociaciones entre la cantidad de ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1 y las condiciones climáticas que ocurrieron cuando la hoja estuvo en estado de candela.



**Figura 31.** Evaluación final de la infección de Sigatoka Negra en las hojas de monitoreo molecular temprano (7 SDM) y su relación con las condiciones climáticas presentes durante la semana del desarrollo de hoja candela. **SF**= Tratamiento sin fungicidas (**A, C, E y G**); **CF**= Tratamiento con fungicidas (**B, D, F y H**). **SHC**= Semana de desarrollo de la hoja candela; **SMF**= Semana de muestreo foliar; **SEV**= Semana de evaluación final. **P**= Precipitación; **Tp Máx**= Temperatura promedio máxima; **Tp Mín**= Temperatura promedio mínima; **HR**= Humedad relativa. Río Frío, 2018.

En la Figura 32 se observa que las variables de clima de mayor asociación ( $R^2$ ) con la cantidad de ADN del hongo para los tratamientos (SF y CF) fueron la duración de la precipitación (0,45 y 0,54), temperatura promedio (0,54 y 0,17), humedad relativa (0,43 y 0,38) y la radiación solar (0,34 y 0,52). Se observó un efecto de los fungicidas sobre la cantidad de ADN de *P. fijiensis*, sin embargo, la relación entre variables se mantiene y esto indicó la posibilidad de escape del patógeno al fungicida y su proceso de infección en la hoja candela.



**Figura 32.** Relación entre la cantidad de ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1 y las condiciones climáticas cuando la hoja estuvo en su estado de hoja candela en plantas de los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.

### 3.6. DISCUSIÓN

Las condiciones climáticas que ocurrieron durante el desarrollo de esta investigación presentaron variaciones estacionales de semanas secas y lluviosas, sin embargo, las precipitaciones fueron muy frecuentes, por cuanto las condiciones de altas y constantes precipitaciones, temperaturas entre 18 °C a 32 °C, humedades relativas superiores al 80 %, humedad foliar presente y las variaciones de la radiación solar por efecto de la nubosidad, fueron las condiciones idóneas para el desarrollo de Sigatoka Negra; la cuales se presentan regularmente en las zonas bananeras de Costa Rica y que resultan óptimas para aumentar la agresividad de la enfermedad (Robinson y Galán 2012). Por lo anterior, los resultados obtenidos en las variables de la cantidad de ADN de *Pseudocercospora fijiensis* y el porcentaje de área necrosada (infección) evidencian la importante influencia del clima sobre la dinámica epidemiológica del patógeno (Martínez 2012).

Determinar la cantidad de inóculo ambiental o efectivo en el tejido de la hoja es un parámetro importante en los estudios epidemiológicos de la enfermedad Sigatoka Negra, por ser el inicio del ciclo de la misma (Burt *et al.* 1999). En este estudio, la variable de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* se realizó por medio de la medición del crecimiento del hongo en el tejido foliar en un tiempo determinado, desde los eventos efectivos de infección en la hoja estado candela hasta el momento cuando la hoja llegó a la posición 1 en la planta. En ese proceso de apertura de hojas candela las condiciones climáticas tuvieron un efecto significativo sobre la cantidad de ADN del patógeno. Lo anterior obedece a que el patógeno causante de la enfermedad Sigatoka Negra utiliza dos medios de dispersión: las ascosporas; que permiten la diseminación a largas distancias (100 km) y que se encuentran en grandes cantidades en las plantaciones, y los conidios, que tienen importancia como inóculo secundario (Burt 2003, Guzmán 2003). El hongo requiere de condiciones climáticas de humedad constante sobre la hoja y temperaturas entre 21,5 °C a 28 °C para iniciar y desarrollar sus procesos de infección como la germinación, penetración del hospedero, desarrollo de síntomas que causan destrucción de células del mesófilo de la hoja y la producción de esporas (Stover

1983, Henderson *et al.* 2006, Churchill 2011). Por lo tanto, las variables climáticas evaluadas en conjunto con la cantidad de ascosporas que efectivamente son depositadas e infectan el envés de la hoja candela, sirvieron de base para un monitoreo molecular temprano realizando la cuantificación del ADN del hongo y las relaciones encontradas con la infección (%) en plantas bajo condiciones naturales donde no se aplicaron fungicidas.

El ciclo de la enfermedad inicia con la deposición de esporas sobre la superficie abaxial (envés) de la hoja en estado candela, las variaciones semanales encontradas en los resultados de la cantidad de ADN del hongo y consecuentemente en los posteriores síntomas de infección (%), se debieron a la influencia del clima sobre los procesos de infección del patógeno. Gauhl (1994) encontró que la producción de inóculo se ve reducida durante los meses menos lluviosos del año en el Caribe de Costa Rica, lo cual explica la fluctuación en la cantidad de ADN del patógeno y la infección (%) en las hojas evaluadas, esto obedece al papel predominante que juega el agua en la hoja para la formación y liberación de las ascosporas (Meredith y Lawrence 1969, Meredith *et al.* 1973, Stover 1980, Bennett y Arnerson 2003, Marín *et al.* 2003).

Las relaciones ( $R^2$ ) encontradas entre la cantidad de ADN de *P. fijiensis* y las condiciones climáticas como la duración de la precipitación, temperatura promedio, humedad relativa y radiación solar, los resultados coinciden a lo explicado por Jácome *et al.* (1991) y Gauhl (1994) que en sus estudios de epidemiología de la enfermedad Sigatoka Negra determinaron que la máxima germinación y desarrollo del tubo germinativo de las esporas es favorecido por las temperaturas entre 26 °C-28 °C, humedad relativa óptima para ascosporas entre 98 %-100 % y para conidios van desde 92 %-100 %. Por otro lado, Martínez (2012) afirma que el comportamiento de la temperatura del aire, la duración y cantidad del punto de rocío y la lluvia aceleran los procesos de patogénesis, sin embargo, se evidenció en los resultados que temperaturas inferiores a los 20 °C y periodos secos llegaron a inhibir el crecimiento del hongo *P. fijiensis* y retardaron la aparición de síntomas necróticos, lo anterior coincide a lo reportado por Craenen (1998) y Robinson (2012).

Respecto a la radiación solar, en los resultados se observó una relación negativa entre la radiación solar y la cantidad de ADN del hongo, así como también con la infección (%), esto se debió al efecto fungicida de los rayos UV-B y sus intensidades, afectando los procesos metabólicos de los microorganismos presentes en la hoja y en este caso afectando las esporas de *P. fijiensis* depositadas sobre la superficie de la lámina foliar (Carrasco-Ríos 2009). Parnell-Burt y Wilson (1998) en sus estudios en Costa Rica determinaron que las esporas se ven afectadas por la exposición continua durante síes horas a la radiación UV, afectando de igual manera la viabilidad de las ascosporas en el ambiente y su diseminación por viento se llega a reducir a menos de 100 Km.

En la presente investigación se encontró una relación directa entre la cantidad de ADN del patógeno, factores climáticos y el porcentaje de infección (área foliar necrosada) en las plantas del tratamiento sin fungicidas. La relación entre las variables se debió a lo encontrado por Pérez *et al.* (2000) los cuales determinaron que las ascosporas son liberadas entre 10 minutos y 60 minutos posterior al humedecimiento del tejido de la hoja, y esas condiciones también favorecen una rápida germinación, rápido crecimiento de los filamentos germinativos para la penetración vía estomas, así como el crecimiento del hongo en el tejido de la hoja y en un menor tiempo. Por lo tanto, la velocidad de evolución de los síntomas de la enfermedad depende de la temperatura del aire, cantidad de inóculo disponible y la duración de la lluvia, para la cual Pérez *et al.* (2000) encontró relaciones aceptables ( $R^2=0,56$ ) entre la velocidad de evolución de Sigatoka Negra y la duración e intensidad de lluvia acumulada durante catorce días. Las observaciones realizadas por Gómez (2013) indican que, a nivel de laboratorio, la mojadura de la hoja incrementa la esporulación de las lesiones a 24 horas de incubación y pueden ser mayores bajo condiciones de campo.

Con base en lo anterior y de acuerdo con los resultados obtenidos de las regresiones entre las variables climáticas, la cantidad de ADN del hongo y la infección (%) de Sigatoka Negra, se observó en el tratamiento sin aplicación de fungicidas asociaciones para las variables de cantidad de ADN (*P. fijiensis*),

precipitación, temperatura, humedad relativa, humedad foliar y para la radiación solar. En el tratamiento con aplicación de fungicidas las correlaciones se vieron afectadas por el efecto de los fungicidas protectantes y sistémicos aplicados sobre la hoja, llegando a reducir significativamente el desarrollo de los síntomas de Sigatoka Negra y la cantidad de ADN de *P. fijiensis* durante los eventos efectivos de patogénesis; sin embargo, otras variables como el área de hoja evaluada, la duración de altas y bajas temperaturas tuvieron una relación considerable. Por su parte, Torrado y Castaño (2008) mencionan que las variedades altamente susceptibles a la Sigatoka Negra alcanzan en pocas semanas el 100 % de área foliar afectada (infección), y que las condiciones climáticas que favorecen la incidencia y severidad de la enfermedad son: periodos intensos (mm/horas) de precipitación intercaladas con periodos secos, e incrementos de temperaturas graduales desde los 23 °C a los 26 °C.

En referencia a otras variables de importancia en la dinámica de Sigatoka Negra, Aguirre *et al.* (2012) determinaron que las propiedades edafoclimáticas (precipitación, microporosidad y de evaporación) de las zonas bananeras presentaron correlaciones positivas con la incidencia de la enfermedad. Lo anterior está altamente relacionado con la dinámica de esporulación y germinación de esporas. Por su parte, Guzmán (2003) y Meredith *et al.* (1973) mencionan que se ha determinado en estudios en Hawaii y Costa Rica que durante las horas de la noche se liberan abundantemente las ascosporas, estas decrecen durante el día y durante los días lluviosos las liberaciones de ascosporas ocurren rápidamente.

Uno de los objetivos principales de las aplicaciones de protectantes en el cultivo de banano es la protección de la hoja candela, con al menos dos aplicaciones semanales, lo que debería inhibir la germinación de las ascosporas del hongo. Por otro lado, los fungicidas sistémicos aplicados fueron eficaces antes del periodo de incubación (PI) que corresponde a ocho días después de infección, lo anterior según a lo reportado por Murillo (2015). En este estudio los resultados del tratamiento con aplicación de fungicidas evidenciaron la eficacia de los mismos al presentar infecciones inferiores al 10 % en la hoja posición 4-5 (4 SDM), es decir retardando

el periodo de incubación (PI) o aparición masiva de estrías y manchas de Sigatoka Negra.

Por lo anterior, la aplicación de fungicidas sigue siendo la medida más viable y efectiva de obtener una reducción significativa de los daños causados por la enfermedad Sigatoka Negra bajo condiciones climáticas favorables para el patógeno. No obstante, en las plantaciones, se incluyen las prácticas culturales dentro de un programa de manejo integrado de la enfermedad como el deshoje, deshije, densidad de población, drenaje, control de malezas y fertilización (Manzo *et al.* 2005, Martínez 2012, Viljoen *et al.* 2017), lo cual llega a reducir el nivel de inóculo. Según Romero (1996) y Jácome (2003) la información generada sobre la epidemiología de la Sigatoka Negra permite un manejo eficiente de la misma y de mejores estrategias en el uso de los fungicidas. Estos datos de clima más las variables biológicas deben ser utilizados en modelos de predicción de la enfermedad para guiar el uso, frecuencia y rotación de fungicidas sistémicos. Por lo anterior, este sistema se denominó preaviso biológico, sin embargo, en la década de los 90 dichos sistemas perdieron vigencia por la resistencia a fungicidas por parte de la enfermedad (Guzmán 2003). Sin embargo, presentaba la deficiencia de no incluir entre sus variables el inóculo inicial en la lámina foliar.

La principal deficiencia de los modelos de predicción es la no estimación del inóculo, ya sea determinar esporas en el aire o eventos exitosos de infección en la hoja, estas como variables regresoras. De hecho, es importante la cuantificación del inóculo lo más tempranamente posible, ya sea por trampas de esporas o de su crecimiento en la hoja como la cantidad de ADN, como fue el caso en esta investigación. Como ya se demostró, son variables importantes que se consideran en los estudios de epidemiología del patógeno y la relación que tuvo con síntomas estimados visualmente. Los efectos de las variables climáticas en la dinámica de la enfermedad fueron contundentes en los resultados.

Dado que la germinación de esporas y crecimiento del tubo germinativo dependen de condiciones climáticas específicas, si se cuantifican los eventos de



infección y se encuentran correlaciones altas con variables de clima y se establecen correlaciones con infecciones medibles visualmente u otras variables de severidad de la enfermedad Sigatoka Negra en las siguientes semanas, para esa hoja en particular; como es el caso en esta investigación. Entonces se podrá establecer un sistema de detección y cuantificación temprano y un modelo de pronóstico de corto y mediano plazo para Sigatoka Negra en plantas de banano.

### 3.7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que:

La zona bananera de Río Frío presenta condiciones climáticas idóneas para la agresividad de la enfermedad Sigatoka Negra, presentando intensas lluvias durante el primer semestre del año y temperaturas mínimas promedio por encima de los 21,5 °C.

La cantidad de ADN de *Pseudocercospora fijiensis* determinada en la hoja posición 1 presentó una correlación directa con las condiciones climáticas de precipitación, temperaturas, humedad relativa, radiación solar, humedad foliar y unidades de calor, en la semana cuando la hoja estuvo en su estado de candela.

La variable de infección a las 4 SDM presentó correlación aceptable con la cantidad de ADN del patógeno y las condiciones climáticas al momento cuando la hoja estuvo en su estado de hoja candela.

Las aplicaciones de fungicidas tuvieron un efecto significativo en la variable de ADN del hongo y la infección (%) de la enfermedad Sigatoka Negra, ya que afecta las asociaciones ( $R^2$ ) entre las variables de clima y el desarrollo de los síntomas de la misma.

Los resultados explican la importancia significativa de las condiciones climáticas en la epidemiología de la enfermedad Sigatoka Negra, más la inclusión de la variable de ADN del patógeno. Esto abre la posibilidad de utilizar herramientas matemáticas y estadística para desarrollar modelos de predicción temprana de Sigatoka Negra.

### **3.8. RECOMENDACIONES**

Con base en los resultados obtenidos, se recomienda:

Realizar estudios de la relación entre las condiciones climáticas y las variables de la enfermedad; cantidad de ADN del patógeno y las infecciones (% de área necrosada) en diferentes zonas bananeras del Caribe de Costa Rica, así como relacionar otros parámetros comúnmente utilizados para medir la incidencia y severidad de la enfermedad Sigatoka Negra en la industria bananera.

### 3.9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, SE; Piraneque, NV; Menjivar, JC. 2012. Relación entre las propiedades edafoclimáticas y la incidencia de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en la zona bananera del Magdalena-Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental 3(2):13-23.
- Benneth, R; Anerson, P. 2003. Sigatoka negra. The plant health instructor. Cornell University. Spanish traslation by Knight. DOI:10.1094/PHI-I-2005-0217-01. (en línea). Consultado 30 ene 2019. Disponible en <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/BlackSigatokaEspanol.aspx>
- Bornacelly Horta, HR. 2009. Estudio del ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* en tres clones de banano (*Musa AAA*) en tres regiones de la zona bananera del Magdalena. Tesis MSc. Palmira, COL, UNC. 70p.
- Burt, PJA; Rosenberg, LJ; Rutter, J; Ramirez, F; Gonzalez, H. 1999. Forecasting the airborne spread of *Mycosphaerella fijiensis*, a cause of black Sigatoka on banana: estimations of numbers of perithecia and ascospores. Ann. Appl. Biol 135:369-377.
- Burt, PJA. 2003. Airborne dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*. Pag. 111-121. In 2<sup>nd</sup> International workshop INIBAP, *Mycosphaerella fijiensis* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. San José, CR.
- Carrasco-Ríos, 2009. Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. IDESIA 27(3):59-76.
- Churchill, ACL. 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Molecular Plant Pathology 12(4):307-328.
- Craenen, K. 1998. Black Sigatoka disease of banana and plantain. A reference Manual. International Institute of Tropical Agriculture. Ibadam, Nigeria. 58p.

- Di Rienzo J; Casanoves F; Balzarini M; González L; Tablada M; Robledo C. 2018. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, AR. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Gauhl, F. 1994. Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) on plantain and banana (*Musa* spp.) in Costa Rica, Central America. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France
- Gómez Ruíz, ML. 2013. Efecto de las condiciones de incubación y de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Tesis Lic. San Carlos, CR, TEC. 99 p.
- Guzmán, M. 2003. Epidemiología de la Sigatoka Negra y el sistema de preaviso biológico. Pag. 26-27. In Taller INIBAP, Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Guayaquil. ECU.
- Henderson, J; Pattemore, JA; Porchum, SC; Hayden, HL; Van Brunschot, S; Grice, KRE; Peterson, RA; Thomas-Hall, SR; Aitken, EAB. 2006. Black Sigatoka disease: new technologies to strengthen eradication strategies in Australia. Australasian Plant Pathology 35:181-193.
- Hidalgo, M; Tapia, A; Rodríguez, W; Serrano, E. 2006. Efecto de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery). Agronomía Costarricense 30(1):45-41.
- Jácome, L; Schun, W; Stevenson, R. 1991. Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis*. Phytopathology 81: 1480-1485.
- Jácome, LH. 2003. Population biology and epidemiology. Pag. 107-110. In 2<sup>nd</sup> International workshop INIBAP, *Mycosphaerella fijiensis* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. San José, CR.

- Lazo, JV; Muñoz, JA; Escalona, A. 2012. Evaluación experimental del clorotalonil en el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plantaciones de plátano (*Musa* spp. AAB). *Bioagro* 24(2):127-134.
- Marín, DH; Romero, RA; Guzmán, M; Sutton, TB. 2003. Black Sigatoka: An increasing treat to banana cultivation. *Plant Disease* 87 (3):208-222.
- Manzo-Sánchez, S; Guzmán-González, S; Rodríguez-García, CM, James, A; Orozco-Santos, M. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1):87-96.
- Martínez, I; Villalta, R; Soto, E; Murillo, G; Guzmán, M. 2011. Manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo de banano (en línea). *Hoja divulgativa* 2011 (2):1-2. Consultado 14 mar. 2018.
- Martínez Bolaños, L. 2012. Epidemiología y manejo de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) del banano (*Musa* AAA). Tesis Doc. Texcoco, MX. 61p.
- Meredith, D; Lawrence, J. 1969. Black leaf streak of banana (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the British Mycological Society 52(3): 459-476.
- Meredith, DS; Lawrence, JS; Firman, ID. 1973. Ascospore release and dispersal in black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*). *Transactions British Mycological Society* 60(3):547-554.
- Murillo Salas, JE. 2015. Efecto de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la eficacia biológica de fungicidas sistémicos utilizados contra la Sigatoka Negra. Tesis Lic. San Carlos, CR, TEC. 176p.
- Parnell, M; Burt, PJA; Wilson; K. 1998. The influence of exposure to ultraviolet radiation in simulated sunlight on ascospores causing black Sigatoka disease of banana and plantain. *Int. J. Biometeorol* 42(1):22-27.
- Pérez-Vicente, L; Mauri-Mollera, F; Hernández-Mancilla, A; Abreu-Antúnez, E; Porras-González, A. 2000. Epidemiología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba. I Pronóstico bioclimático de los

- tratamientos de fungicidas en bananos (*Musa acuminata* AAA). Revista Mexicana de Fitopatología 18 (1):15-26.
- Romero, RA. 1996. Avances en epidemiología y manejo de la Sigatoka Negra del banano. *In* X Congreso Nacional Agronómico/III Congreso de Fitopatología. Dirección de Investigaciones Agrícolas CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Robinson, J.C; Galán, V. 2012. Bananos y plátanos. Madrid, ESP. Ediciones Mandí-Prensa. 321 p.
- Soto, E; Guzmán, M. 2011. Unidades de Calor (UC): su interpretación y utilidad en la producción de banano. *In* Hoja Divulgativa N°1. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Stover, RH. 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantains. *Plant Disease* 64:750-756.
- Stover, RH. 1983. The effect of temperature on ascospores germinative tube growth of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Fruits* 38:626-628.
- Torrado-Jaime, M; Castaño-Zapata, J. 2008. Incidencia y severidad de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach et Mulder) del plátano según los estados fenológicos. *Agronomía Colombiana* 26(3):435-442.
- Viljoen, A; Mahuku, G; Massawe, C; Ssali, R; Kimunye, J; Mostert, G; Ndayihanzamaso, P; Coyne, D. 2017. Banana diseases and pest: fields guide for diagnostics and data collection. Ibadan, Nigeria, IITA. 73 p.

## **CAPÍTULO IV. Desarrollo de modelos predictivos de la infección foliar causada por Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*) en plantas de banano (*Musa AAA*)**

### **4.1. RESUMEN**

La presente etapa de la investigación se llevó a cabo con el objetivo de desarrollar modelos de predicción temprana de la infección foliar (% área foliar necrosada) de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas de banano, con la integración de variables de inóculo (ADN), crecimiento y climáticas estrechamente relacionadas con la epidemiología de la enfermedad. Se construyeron tres modelos predictivos para la variable dependiente de infección (%) con valores de predicción altos ( $R^2=0,98$ ; 0,91; 0,71) para el tratamiento de plantas sin aplicación de fungicidas, mientras para plantas con aplicación de fungicidas el efecto de los mismos fue significativo en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad y obtuvieron valores de predicción aceptables ( $R^2=0,99$ ; 0,87; 0,43) para estimar la infección (%) con una anticipación de al menos cuatro semanas. Las variables regresoras más relacionadas fueron la cantidad de ADN de *P. fijiensis*, área de hoja evaluada y entre las climáticas fueron la precipitación, temperatura promedio (máxima y mínima), humedad relativa, humedad foliar y radiación solar. Se determinaron modelos predictivos para estimar la variable dependiente de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en la hoja posición 1 para plantas sin aplicación de fungicidas ( $R^2=0,73$ ;  $p<0,0001$ ) y plantas con aplicación de fungicidas ( $R^2=0,55$ ;  $p<0,0001$ ) donde las variables regresoras de mayor relación fueron la duración de la precipitación, temperatura promedio, humedad relativa, humedad foliar y la radiación solar; donde el crecimiento del patógeno antes de la cuantificación molecular (ADN) no se ve afectada por la aplicación frecuente de fungicidas.

**Palabras clave:** Sigatoka Negra, modelos predictivos, infección foliar, *Musa AAA*.



## 4.2. ABSTRACT

The objective in this chapter was to develop a model of early prediction of foliar infection (% necrosed leaf area) of Black Sigatoka disease in banana plants, using variables such as inoculum (DNA quantification), growth and weather conditions, which are closely related to the epidemiology of the disease. Three predictive models were constructed for the infection-dependent variable (%) with high prediction values  $R^2=0.98$ ,  $0.91$ ,  $0.71$ ; for the treatment of plants without application of fungicides, while for plants under fungicide application the prediction values were  $R^2=0.99$ ,  $0.87$ ,  $0.43$ . All models were able to predict the infection (%) with four weeks before it occurred. The highest correlated variables were the amount of *P. fijiensis* DNA and infection; and precipitation, average temperature (maximum and minimum), relative humidity, leaf wetness and solar radiation. Predictive models were determined to estimate the variable dependent on the amount of *P. fijiensis* DNA present in leaf position 1 for plants without application of fungicides ( $R^2=0.73$ ,  $p < 0.0001$ ) and plants with application of fungicides ( $R^2=0.55$ ,  $p < 0.0001$ ) where variables with highest correlation were the duration of precipitation, average temperature, relative humidity, leaf wetness and solar radiation; where the growth of the pathogen before molecular quantification (DNA) is not affected by the-application of fungicides.

**Key words:** Black Sigatoka, predictive models, foliar infection, *Musa* AAA.

### 4.3. INTRODUCCIÓN

Los patógenos que causan infecciones foliares en diversos cultivos tienen dinámicas influidas por las condiciones ambientales, variabilidad de inóculo, así como su patogenicidad y la susceptibilidad del hospedero (Agrios 2005). Estas variables pueden ser analizadas e interpretadas matemática y estadísticamente para determinar las relaciones entre patógeno, clima y hospedero con la finalidad de generar modelos de pronóstico.

Dentro de las áreas de la fitopatología, la epidemiología es una disciplina utilizada para la descripción del proceso de desarrollo de las enfermedades en diversos niveles, y permite el uso de modelos de predicción (Gómez 2017). Los modelos más comunes son empíricos y se basan en relaciones estadísticas entre las variables ambientales y variables epidemiológicas como esporulación, dispersión, infección, incubación e integración (Magarey *et al.* 2006, Contreras-Medina *et al.* 2009).

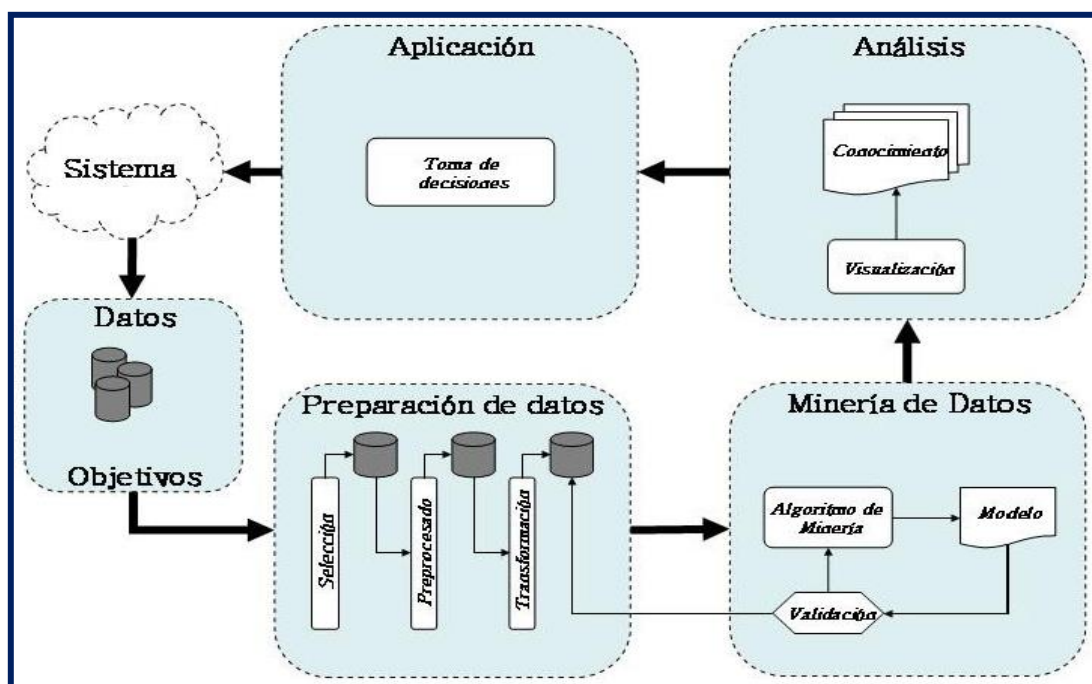
Desde los años 80 se han desarrollado estudios para la modelación predictiva de la enfermedad Sigatoka Negra en el cultivo de banano. Ochoa *et al.* (2016) mencionan que la variabilidad climática del espacio-tiempo maneja la epidemiología de la enfermedad Sigatoka Negra, donde las variables meteorológicas relacionadas son la temperatura del aire, lluvia, humedad relativa y humedad foliar. Las integraciones de estas variables en modelos de pronóstico podrían funcionar como parámetros indicadores en el estratégico de los fungicidas (Ochoa *et al.* 2016).

Una de las limitantes que presentan las metodologías de evaluación en campo, es que se basan en una evaluación visual de síntomas, que causaron un daño fisiológico, por lo tanto, la efectividad de los fungicidas en estados avanzados de la enfermedad es limitada. Además, no se determina el nivel de inóculo en el ambiente o la cantidad de eventos efectivos de infección en la hoja. Ante este panorama, este último Capítulo tiene como objetivo desarrollar modelos de predicción temprana utilizando la cantidad de ADN de *P. fijiensis* y las variables climáticas para estimar el nivel de infección (% área foliar necrosada) en plantas de banano.

## 4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.4.1. Descripción de la investigación

Esta etapa de la investigación consistió en el desarrollo de los modelos de predicción temprana (regresión múltiple), utilizando los datos presentados en los Capítulos anteriores (II y III). Se integraron las variables regresoras (ADN y climáticas) para la predicción temprana de la variable dependiente infección foliar (%) de Sigatoka Negra (*P. fijiensis*) y el ADN del patógeno en las plantas de los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas (T2 y T1 respectivamente). A partir del muestreo foliar de la hoja 1 se estimó la infección con un lapso de cuatro semanas después del muestreo (SDM), de igual forma se desarrollaron modelos para predecir la cantidad de ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1, y posteriormente se estimó la infección (%) de la quinta, sexta, y séptima SDM de la misma hoja, usando el valor estimado de la semana cuatro (SDM). En la siguiente Figura se ilustra la metodología de análisis.



**Figura 33.** Proceso de generación y extracción de conocimiento en bases de datos para generar modelos de predicción. Fuente: Freitez 2007.

#### 4.4.2. Variables de estudio

Las variables estudiadas se detallan en el Cuadro 12:

**Cuadro 12.** Resumen de las variables utilizadas en los modelos predictivos de la infección Sigatoka Negra (*P. fijiensis*). Río Frío, 2018.

Variables de Estudio	Descripción	Abreviatura
Infección 4 SDM (%)		S 4 SDM (%)
Infección 5 SDM (%)	Evaluación visual del área de hoja necrosada (%)	S 5 SDM (%)
Infección 6 SDM (%)		S 6 SDM (%)
Infección 7 SDM (%)		S 7 SDM (%)
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log <sub>10</sub> *	Muestreo foliar de la hoja 1	ADN H1
Área de hoja evaluada (25 %)*	Área de evaluación visual de la Infección (longitud)	AHE
Altura (cm)*	Valor promedio semanal de las variables de crecimiento	A (cm)
Circunferencia (cm)*		C (cm)
Hojas totales*		HT
Temperatura promedio máxima (°C)**	Valor promedio por semana	Tp Máx (°C)
Temperatura promedio mínima (°C)**		Tp Mín (°C)
Temperatura máxima (°C)**		T Máx (°C)
Temperatura mínima (°C)**		T Mín (°C)
Temperatura promedio (°C)**		T Promedio (°C)
Humedad relativa (%)**		HR (%)
Precipitación (mm)**		P (mm)
Precipitación (horas)**	P (h)	
Temperatura máxima óptima (horas)***	Valor acumulado por semana	T Máx Ópt (h)
Temperatura mínima óptima (horas)***		T Mín Ópt (h)
Temperatura alta (horas)**		T Alta (h)
Temperatura baja (horas)**		T baja (h)
Temperatura óptima (horas)**		T Ópt (h)
Humedad relativa >90 % (horas)***		HR>90% (h)
Humedad foliar (mm)**		HF (mm)
Humedad foliar (horas)**		HF (h)
Luz (horas)**		Luz (h)
Unidad de calor (°C)**		UC (°C)
Radiación solar (W m <sup>-2</sup> )**		Rs (W m <sup>-2</sup> )

\* = Variables recolectadas durante el muestreo temprano de la hoja 1; 4 semanas antes de la evaluación de infección (%).

\*\* = Condiciones climáticas observadas durante el desarrollo de la hoja candela; una semana antes del muestreo foliar y 5 semanas antes de la evaluación de infección (%).

\*\*\* = Condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad, temperaturas de 25 °C a 28 °C y humedad relativa mayor al 90 %.

#### 4.4.3. Diseño experimental

La ecuación del modelo de regresión lineal múltiple para cada tratamiento fue:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \dots + \beta_k x_{ki} + \varepsilon_i$$

En dónde:

$Y_i$  = *i*-ésima observación de la variable dependiente *Y*

$x_{1i}, x_{2i}, \dots, x_{ki}$  = *i*-ésimo valor de las variables regresoras  $x_1, x_2, \dots, x_k$  o independientes

$\beta_0$  = parámetro desconocido que representa la ordenada al origen de la recta (indica el valor esperado de *Y* cuando  $x_1 = 0, x_2 = 0, \dots, x_k = 0$ )

$\beta_1, \dots, \beta_k$  = parámetros desconocidos que representan las tasas de cambio en *Y* frente al cambio unitario de  $x_1, x_2, \dots, x_k$ , respectivamente

$\varepsilon_i$  = término de error aleatorio

#### 4.4.4. Análisis de datos

Se generaron dos bases de datos, la primera para el desarrollo de los modelos de regresión múltiple y la segunda que contenía datos previamente seleccionados para la validación de los modelos de predicción temprana. Los datos de las bases de datos fueron analizados con el paquete estadístico InfoStat/P (Di Rienzo *et al.* 2018), y se realizaron los siguientes análisis:

##### 4.4.4.1. Análisis estadístico de datos

Se realizó un análisis de regresión lineal y no lineal en los tratamientos; con un nivel de significancia del 5 % ( $p=0,05$ ) y se determinó el  $R^2$ . Se le aplicó transformación logarítmica ( $\log_{10}$ ) a las variables de ADN ( $\text{pg } 10 \text{ cm}^{-2}$ ) y la infección (4 SDM) para obtener mayores correlaciones entre las variables en los modelos de regresión múltiple. Finalmente se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson (*r*) entre la variable dependiente de infección (4 SDM) y las variables

predictoras (inóculo, crecimiento y climáticas), con un nivel de significancia del 5 % ( $p=0,05$ ).

#### **4.4.4.2. Análisis de Componentes Principales (ACP)**

Con el objetivo de seleccionar las variables de mayor relación y reducir el grupo de variables se realizó un análisis multivariado de componentes principales con las variables predictoras de mayor correlación lineal de Pearson ( $r$ ) con la variable dependiente (Cuadro 12) y se obtuvo la mayor variabilidad explicada por medio de la correlación cofenética (>90 %) del conjunto de datos.

#### **4.4.4.2. Análisis de regresión múltiple**

Se generaron tres modelos para cada tratamiento (con y sin fungicidas): el primero ( $n=15$ ) y el segundo ( $n=30$ ) consisten en el promedio de datos por semana, buscando mejorar la correlación entre los datos de las variables estudiadas, mientras que el tercer modelo fue desarrollado con la base de datos completa ( $n=150$ ). Se realizó el análisis de regresión lineal múltiple con las variables predictoras de mayor correlación positiva y negativa; con la mayor variabilidad explicada (componentes principales), y se elaboraron los modelos de regresión lineal múltiple con las variables ya determinadas. Se seleccionaron aquellos modelos que presentaron los siguientes criterios: significancia del 5 % ( $p=0,05$ ), mayor coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$  Aj), AIC, BIC y ECMP menores, tanto en los modelos como en sus variables de predicción e intercepto de los modelos. El análisis fue realizado para la variable dependiente infección (% 4 SDM) y también para modelos de predicción de la cantidad del ADN de *P. fijiensis* presente en la hoja posición 1 en la planta de banano.

#### **4.4.4.3. Validación de modelos**

La validación de los modelos se realizó con los datos de la base de datos previamente seleccionada (20 % de datos seleccionados al azar), antes del desarrollo de los modelos de predicción. Con los modelos se estimó de forma temprana la infección (% 4 SDM) de Sigatoka Negra (*P. fijiensis*) en cada

tratamiento y se realizaron curvas comparativas entre la infección observada y la estimada por los modelos, lo mismo se aplicó a los modelos predictivos de la cantidad de ADN de *P. fijiensis*. Los datos se sometieron a pruebas estadísticas de sesgo ( $\pm 2\%$ ) y prueba de Wilcoxon ( $p > 0,05$ ), para valorar la similitud entre los valores estimados y los observados. La fórmula del sesgo utilizada es la siguiente:

$$S(\%) = \frac{\sum(Y_{obs} - Y_{est})}{\sum(Y_{obs})} \times 100$$

En dónde:

$S(\%)$  = porcentaje de sesgo

$Y_{obs}$  = infección observada (4 SDM)

$Y_{est}$  = infección estimada (4 SDM)

## 4.5. RESULTADOS

### 4.5.1. Modelos de predicción temprana de la infección de Sigatoka Negra en plantas de banano

Con base en los resultados obtenidos en los Capítulos II y III de esta investigación se emplearon metodologías de análisis estadísticos para el desarrollo de modelos de predicción temprana de la infección entendiéndose el término como el área foliar necrosada (%) por Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*) en plantas de banano, a partir de variables de inóculo (ADN), crecimiento y climáticas como variables predictoras de la dinámica de la enfermedad bajo condiciones naturales (sin aplicación de fungicidas) y condiciones con aplicación de fungicidas.

En el Cuadro 13 se detallan los resultados del análisis de correlación lineal de Pearson ( $r$ ) para cada modelo de predicción de la variable dependiente infección (% 4 SDM). Para el tratamiento sin aplicación de fungicidas (SF) se observaron correlaciones aceptables ( $r > 0,30$ ) y significativas ( $p < 0,05$ ) para las siguientes variables regresoras: ADN, área de hoja evaluada, precipitación, temperatura promedio mínima, temperatura promedio, temperatura máxima y mínima, temperaturas óptimas, humedad relativa, humedad relativa mayor al 90 %, humedad foliar, luz, unidades de calor y radiación solar. Mientras que para el tratamiento con aplicación de fungicidas (CF) las variables con mayor correlación fueron: área de hoja evaluada, temperatura máxima y mínima promedio, temperatura máxima y mínima, temperatura alta, humedad relativa, unidades de calor y radiación solar.

Para los modelos del tratamiento con aplicación de fungicidas se encontraron correlaciones negativas ( $r < 0$ ) y significativas ( $p < 0,05$ ) en comparación al tratamiento sin aplicación de fungicidas ( $r > 0$ ) debido al efecto de los fungicidas. Por otro lado, se encontraron correlaciones lineales altas ( $r > 0,65$ ) y significativas ( $p < 0,0001$ ) entre la infección (% 4 SDM) y las siguientes infecciones en la misma hoja evaluada a 5, 6 y 7 SDM (%), lo que indica que la infección estimada a las cuatro semanas puede ser a su vez un predictor del avance de la enfermedad.



**Cuadro 13.** Análisis de Correlación lineal de Pearson entre la infección y variables climáticas en las plantas de los tratamientos (CF y SF). Río Frío, 2018.

Variables	Infección 4 SDM (%)											
	Modelo 1 <sup>§</sup>				Modelo 2 <sup>£</sup>				Modelo 3 <sup>π</sup>			
	SF		CF		SF <sup>α</sup>		CF		SF <sup>α</sup>		CF <sup>β</sup>	
	r*	p - valor**	r	p - valor	r	p - valor	r	p - valor	r	p - valor	r	p - valor
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log <sub>10</sub>	0,60	0,0190	-0,02	0,9538	0,66	0,0001	0,17	0,3618	0,55	<0,0001	0,07	0,4432
Área de hoja evaluada (25 %)	0,36	0,1865	-0,61	0,0151	0,32	0,0839	-0,41	0,0256	0,28	0,0005	-0,47	<0,0001
Altura (cm)	0,41	0,1329	-0,60	0,0177	0,35	0,0603	-0,38	0,0358	0,30	0,0002	-0,46	<0,0001
Circunferencia (cm)	0,41	0,1322	-0,53	0,0402	0,35	0,0602	-0,33	0,0743	0,29	0,0003	-0,44	<0,0001
Hojas totales	0,34	0,2104	-0,61	0,0160	0,23	0,2300	-0,42	0,0221	0,06	0,4602	-0,44	<0,0001
Precipitación (mm)	0,50	0,0563	-0,17	0,5469	0,44	0,0147	0,04	0,8216	0,40	<0,0001	-0,13	0,1132
Precipitación (h)	0,49	0,0642	0,08	0,7684	0,61	0,0003	0,34	0,0627	0,46	<0,0001	0,05	0,5261
Temperatura promedio máxima (°C)	0,15	0,5905	-0,51	0,0526	0,11	0,5687	-0,40	0,0287	0,09	0,2758	-0,44	<0,0001
Temperatura promedio mínima (°C)	0,19	0,5092	-0,47	0,0781	0,15	0,4444	-0,36	0,0516	0,20	0,0161	0,00	0,9750
Temperatura máxima (°C)	0,25	0,3640	-0,75	0,0014	0,22	0,2490	-0,52	0,0029	0,16	0,0481	-0,50	<0,0001
Temperatura mínima (°C)	0,61	0,0147	-0,08	0,7749	0,57	0,0011	0,02	0,9013	0,10	0,2042	-0,43	<0,0001
Temperatura promedio (°C)	0,52	0,0458	-0,41	0,1250	0,47	0,0087	-0,24	0,2043	0,15	0,0629	0,05	0,5129
Temperatura máxima óptima (h)	0,22	0,4329	0,15	0,6040	0,33	0,0743	0,17	0,3696	0,46	<0,0001	-0,15	0,0616
Temperatura mínima óptima (h)	0,19	0,5031	0,31	0,2674	0,30	0,1094	0,19	0,3116	0,38	<0,0001	-0,34	<0,0001
Temperatura alta (h)	-0,21	0,4617	-0,64	0,0098	-0,26	0,1613	-0,47	0,0082	-0,21	0,0090	-0,48	<0,0001
Temperatura baja (h)	-0,12	0,6723	0,31	0,2559	-0,06	0,7431	0,29	0,1253	-0,05	0,5518	0,35	<0,0001
Temperatura óptima (h)	0,40	0,1406	0,20	0,4849	0,38	0,0383	0,08	0,6854	0,31	0,0001	-0,01	0,9100

continua en la siguiente página

**Cuadro 13.** Análisis de Correlación lineal de Pearson entre la infección y variables climáticas en plantas de tratamientos con y sin aplicación de fungicidas (CF y SF). Río Frío, 2018.

Variables	Infección 4 SDM (%)											
	Modelo 1 $\text{¥}$				Modelo 2 $\text{£}$				Modelo 3 $\text{π}$			
	SF		CF		SF $\alpha$		CF		SF $\alpha$		CF $\beta$	
	r*	p - valor**	r	p - valor	r	p - valor	r	p - valor	r	p - valor	r	p - valor
Humedad relativa (%)	0,73	0,0020	0,20	0,4698	0,82	<0,0001	0,34	0,0678	0,65	<0,0001	0,09	0,2629
Humedad relativa >90 % (h)	0,64	0,0098	0,19	0,4974	0,76	<0,0001	0,34	0,0637	0,59	<0,0001	0,09	0,2514
Humedad foliar (mm)	0,50	0,0554	0,15	0,6010	0,68	<0,0001	0,31	0,0917	0,50	<0,0001	0,10	0,2041
Humedad foliar (h)	0,49	0,0634	0,20	0,4836	0,68	<0,0001	0,32	0,0799	0,50	<0,0001	0,14	0,0913
Luz (h)	-0,56	0,0297	-0,07	0,8111	-0,64	0,0001	-0,21	0,2566	-0,49	<0,0001	0,01	0,9327
Unidad de calor (°C)	0,33	0,2261	-0,47	0,0739	0,26	0,1629	-0,32	0,0836	0,22	0,0064	-0,41	<0,0001
Radiación solar (W m <sup>-2</sup> )	-0,69	0,0043	-0,39	0,1551	-0,79	<0,0001	-0,43	0,0170	-0,62	<0,0001	-0,22	0,0072
Infección 5 SDM (%)	0,93	<0,0001	0,88	<0,0001	0,92	<0,0001	0,92	<0,0001	0,86	<0,0001	0,78	<0,0001
Infección 6 SDM (%)	0,84	0,0001	0,91	<0,0001	0,87	<0,0001	0,90	<0,0001	0,73	<0,0001	0,73	<0,0001
Infección 7 SDM (%)	0,77	0,0008	0,81	0,0003	0,78	<0,0001	0,86	<0,0001	0,64	<0,0001	0,67	<0,0001

\* = Coeficiente de correlación lineal de Pearson

\*\* = Nivel de probabilidad de la correlación lineal (p= 0,05)

¥ = Promedio de la evaluación de 10 plantas por tratamiento durante 15 semanas

SF = Sin aplicación de fungicidas

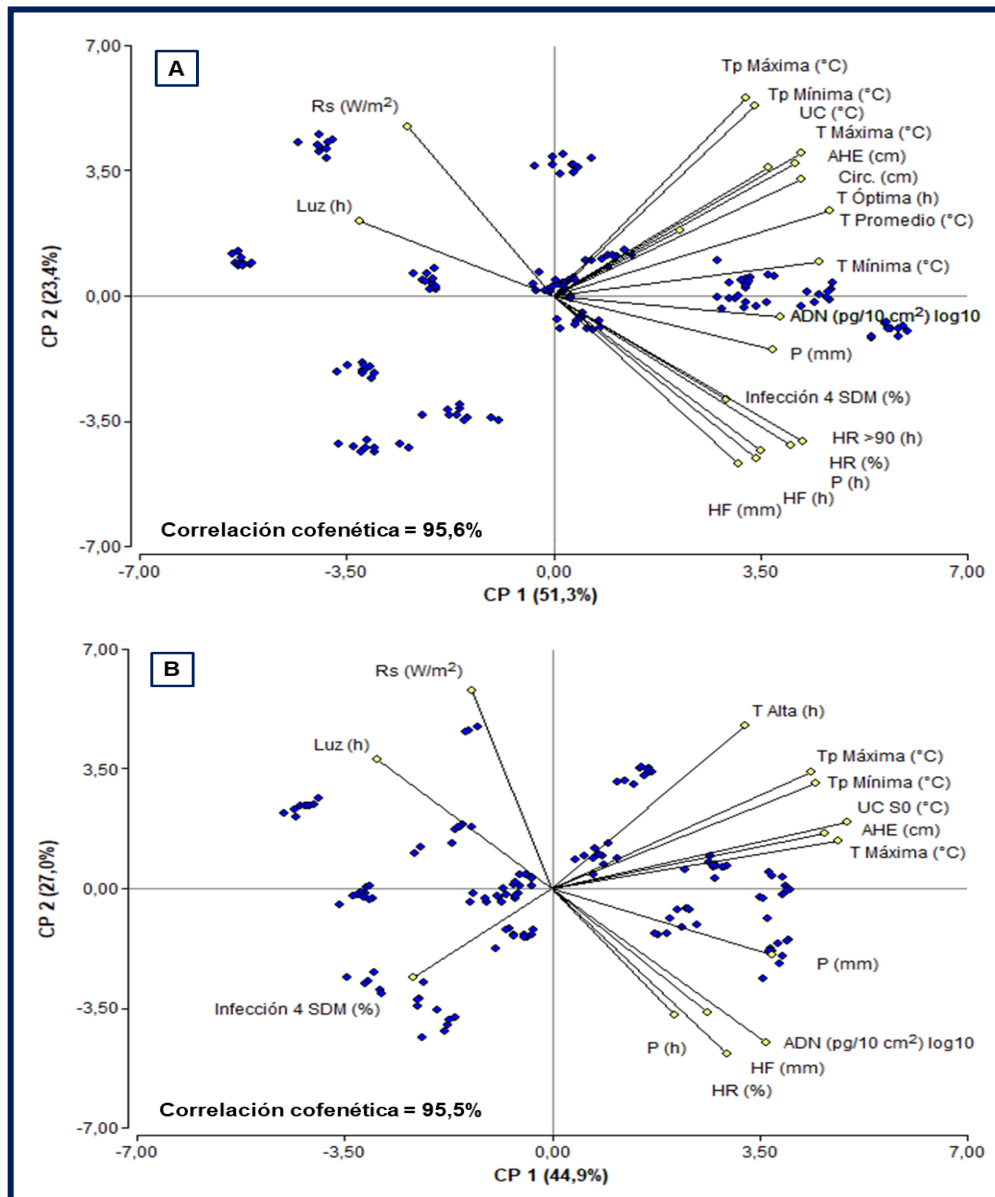
£ = Promedio de la evaluación de 20 plantas por tratamiento durante 15 semanas

π = Evaluación de 10 plantas por tratamiento durante 15 semanas

α = Valores transformados a Log<sub>10</sub>; β = Valores transformados a Log<sub>10</sub> (x+1)

CF = Con aplicación de fungicidas

En la Figura 34 se determinaron por medio de un análisis de componentes principales (ACP) las variables de las bases de datos, donde se resumen las variables con mayor variabilidad explicada (95,6 %) para el tratamiento sin aplicación de fungicidas (SF) en la Figura 34A y en la Figura 34B del tratamiento con fungicidas (CF). La variabilidad explicada fue del 95,5 %, donde el CP1 agrupa el mayor porcentaje de datos de los tratamientos.



**Figura 34.** Análisis de Componentes Principales (ACP) entre las variables predictoras y la infección (%) de Sigatoka Negra. **(A)** Tratamiento sin aplicación de fungicidas; **(B)** Tratamiento con aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.

En los siguientes cuadros se resumen los modelos desarrollados:

**Cuadro 14.** Modelos utilizados para la predicción de la infección (%) de Sigatoka Negra en plantas sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.

<b>Infección 4 SDM (%)</b>		
<b>Modelo 1. R<sup>2</sup> = 0,98</b>		
<b>Efecto</b>	<b>Estimador</b>	<b>P&gt;T</b>
Intercepto	369,934	0,0014
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log <sub>10</sub>	4,90948	0,0086
Área de hoja evaluada (cm)	-1,08441	0,0116
Circunferencia (cm)	1,57741	0,0034
Precipitación (mm)	0,20066	0,0004
Precipitación (h)	-2,01096	0,0004
Temperatura promedio máxima (°C)	-52,454	0,0115
Temperatura promedio mínima (°C)	40,004	0,0212
Humedad foliar (mm)	0,01502	0,0385
Radiación solar (W m <sup>-2</sup> )	-0,00029	0,0036
<b>Infección 4 SDM (%)*</b>		
<b>Modelo 2. R<sup>2</sup> = 0,89</b>		
<b>Efecto</b>	<b>Estimador</b>	<b>P&gt;T</b>
Intercepto	-10,958	0,0066
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log <sub>10</sub>	0,4761	0,0010
Área de hoja evaluada (cm)	-0,0343	0,0100
Precipitación (h)	-0,0560	0,0061
Temperatura promedio máxima (°C)	0,5767	0,0055
Temperatura mínima (°C)	-0,1834	0,0261
Humedad foliar (h)	0,1904	0,0124
Humedad foliar (mm)	-0,0176	0,0180
Luz (h)	0,1010	0,0014
Radiación solar (W m <sup>-2</sup> )	-0,000045	0,0002
<b>Infección 4 SDM (%)*</b>		
<b>Modelo 3. R<sup>2</sup> = 0,71</b>		
<b>Efecto</b>	<b>Estimador</b>	<b>P&gt;T</b>
Intercepto	52,688	<0,0001
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log <sub>10</sub>	0,1332	0,0001
Precipitación (mm)	0,0864	<0,0001
Precipitación (mm) <sup>2</sup>	-0,00021	<0,0001
Precipitación (h)	-0,2804	<0,0001
Temperatura máxima (°C)	3,0459	0,0054
Temperatura mínima (°C)	3,8208	0,0025
Temperatura promedio (°C)	-6,8309	0,0030
Temperatura óptima (h)	0,0518	0,0162
Humedad relativa S0 (%)	-0,4791	0,0007
Humedad relativa >90 S0 (h)	-0,0817	0,0061
Humedad foliar S0 (h)	0,5099	0,0014
Humedad foliar S0 (mm)	-0,0308	0,0028
Luz S0 (h)	-0,0562	0,0133
Unidades de calor (°C)	-0,1130	0,0037
Radiación solar (W m <sup>-2</sup> )	-0,00007	<0,0001

\*= Variables dependientes con transformación logarítmica (log<sub>10</sub>)

**Cuadro 15.** Modelos utilizados para la predicción de la infección (%) de Sigatoka Negra en plantas con aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.

<b>Infección 4 SDM (%)</b>		
<b>Modelo 1. R<sup>2</sup> = 0,99</b>		
<b>Efecto</b>	<b>Estimador</b>	<b>P&gt;T</b>
Intercepto	-280,900	0,0030
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log <sub>10</sub>	-2,9264	0,0033
Área de hoja evaluada (cm)	-0,0830	0,0259
Precipitación (mm)	-0,0179	0,0421
Precipitación (h)	0,3950	0,0068
Temperatura promedio máxima (°C)	21,662	0,0127
Temperatura promedio mínima (°C)	-10,138	0,0459
Humedad relativa (%)	1,5002	0,0031
Humedad foliar (mm)	-0,0293	0,0037
Luz (h)	0,1254	0,0586
Unidades de calor (°C)	-1,5205	0,0031
Radiación solar (W m <sup>-2</sup> )	0,0000403	0,0931

<b>Infección 4 SDM (%)</b>		
<b>Modelo 2. R<sup>2</sup> = 0,87</b>		
<b>Efecto</b>	<b>Estimador</b>	<b>P&gt;T</b>
Intercepto	-125,380	0,0001
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log <sub>10</sub>	-0,8062	0,0115
Área de hoja evaluada (cm)	-0,7502	0,0005
Área de hoja evaluada (cm) <sup>2</sup>	0,00754	0,0054
Precipitación (mm) <sup>2</sup>	-0,0000763	0,0012
Precipitación (h) <sup>2</sup>	0,00772	<0,0001
Temperatura promedio máxima (°C)	-9,4212	0,0120
Temperatura promedio mínima (°C)	8,5661	0,0115
Humedad relativa (%) <sup>2</sup>	0,003784	0,0017
Humedad foliar (mm) <sup>2</sup>	-0,0000222	0,0001
Radiación solar (W m <sup>-2</sup> )	0,002791	<0,0001
Radiación solar (W m <sup>-2</sup> ) <sup>2</sup>	-0,000000012	<0,0001

<b>Infección 4 SDM (%)*</b>		
<b>Modelo 3. R<sup>2</sup> = 0,43</b>		
<b>Efecto</b>	<b>Estimador</b>	<b>P&gt;T</b>
Intercepto	-15,575	0,0083
ADN (pg 10 cm <sup>-2</sup> ) log <sub>10</sub>	0,1018	0,0015
Área de hoja evaluada (cm)	-0,0173	0,0007
Precipitación (h)	-0,1862	0,0001
Precipitación (h) <sup>2</sup>	0,0035951	0,0001
Precipitación (mm)	0,02792	0,0013
Precipitación (mm) <sup>2</sup>	-0,0000812	0,0019
Temperatura promedio máxima (°C)	0,8399	0,0051
Temperatura máxima (°C)	0,1553	0,0419
Temperatura alta (h)	-0,0254	0,0002
Unidades de calor (°C)	-0,1275	0,0049
Humedad foliar (mm)	0,002276	0,0006

\*= Variables dependientes con transformación logarítmica (log<sub>10</sub> (x+1))

En los anteriores Cuadros 14 y 15 se resumen los modelos de regresión múltiple desarrollados para la predicción temprana de la infección a la cuarta SDM (%) para los tratamientos (SF y CF). Para el tratamiento SF los modelos presentaron coeficientes de determinación altos ( $R^2=0,98$ ; 0,91; 0,71) y se determinaron 11 variables predictoras altamente significativas ( $p<0,05$ ) en los modelos que predicen tempranamente la dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra en plantas bajo condiciones naturales (sin fungicidas). Por otro lado, los modelos del tratamiento con aplicación de fungicidas presentaron valores de  $R^2$  altos (0,99; 0,87; 0,43) en los dos primeros modelos, a excepción del tercer modelo y donde las variables si fueron altamente significativas para la predicción de la enfermedad Sigatoka Negra.

Cabe recalcar que en todos los modelos desarrollados la variable de ADN de *P. fijiensis* presentó valores significativos, donde a pesar del efecto de la aplicación de fungicidas sobre el desarrollo de la enfermedad Sigatoka Negra (tratamiento CF), esta variable regresora no mostró correlaciones altas y significativas (ver Cuadro 13); sin embargo, los modelos del tratamiento CF tuvieron un ajuste aceptable con respecto a los valores reales ( $p>0,05$ ).

#### **4.5.2. Validación de modelos de predicción temprana de la infección de Sigatoka Negra en plantas de banano**

En el Cuadro 16 se resumen los análisis de validación de los modelos de regresión múltiple para predicción temprana de la infección a la cuarta SDM (%) en plantas de banano.

Los modelos de ambos tratamientos presentaron coeficientes de determinación ( $R^2$ ) aceptables y significativos ( $p<0,05$ ). Se seleccionaron los modelos con sesgos dentro del rango aceptable ( $\pm 2$  %), esto es la diferencia estadística entre la infección real versus la estimada por el modelo. Al utilizar datos seleccionados al azar, los modelos que presentaron valores de sesgo bajos fueron los modelos uno del tratamiento sin fungicidas con un valor de -1,4 % y 1,1 % con aplicación de fungicidas mientras que el segundo modelo presentó un valor de sesgo de -0,1 %. De igual manera con la prueba de Wilcoxon se encontraron valores no significativos

( $p > 0,05$ ) indicando las similitudes entre la infección real y la estimada para los tratamientos (SF y CF).

**Cuadro 16.** Análisis de validación de los modelos de regresión múltiple utilizados en la predicción de la infección de Sigatoka Negra en plantas con y sin aplicación de fungicidas. Río Frío, 2018.

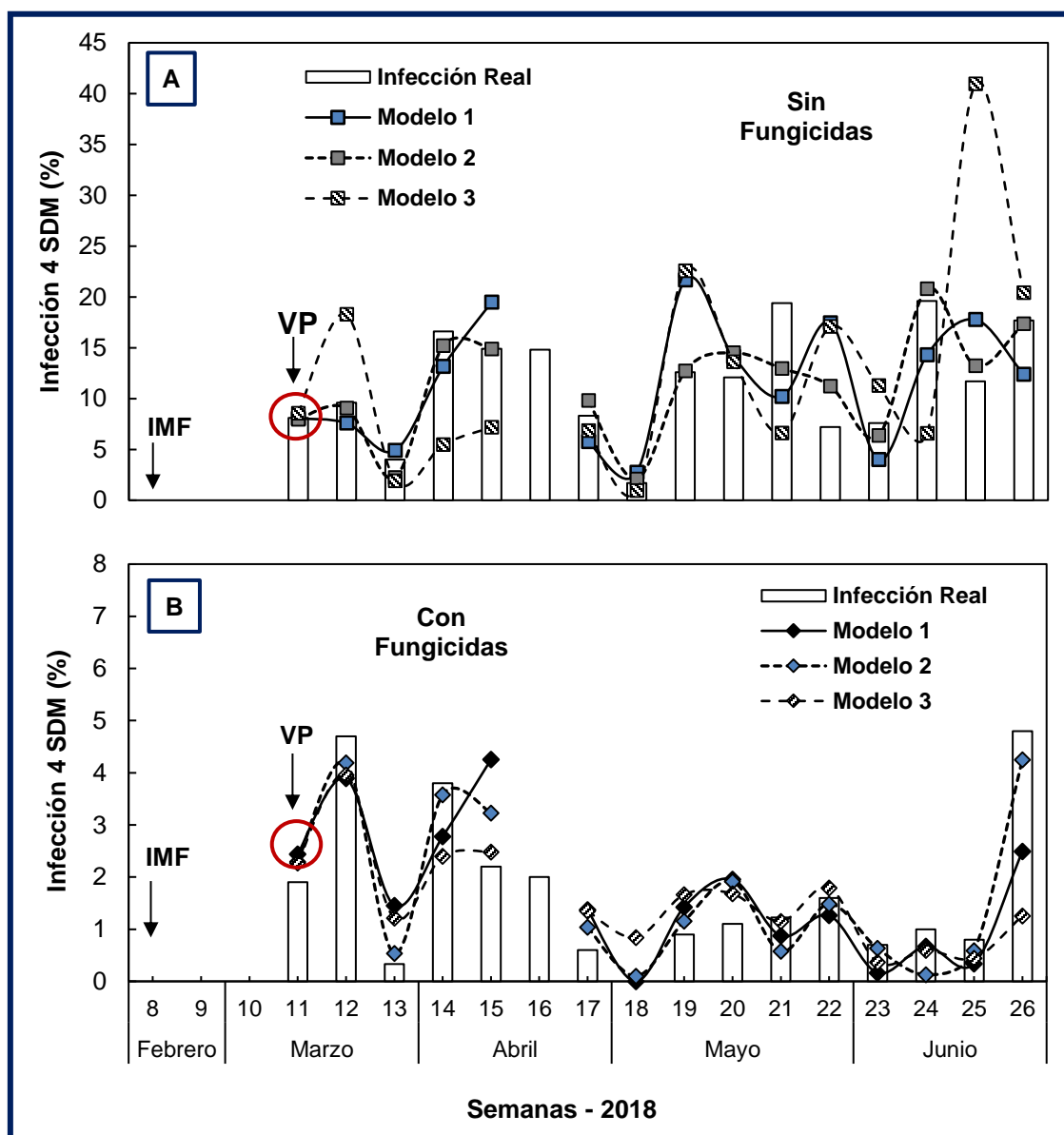
Tratamiento	Modelo	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustado	P>F	ECMP	AIC	BIC	Sesgo (± 2 %)	Wilcoxon ( $p > 0,05$ )
Sin Aplicación de Fungicidas	1	0,98	0,94	0,0014	92,0	62,2	70,0	-1,4	0,9100
	2	0,89	0,85	<0,0001	0,03	-29,9	-14,5	-0,9	0,5624
	3	0,71	0,67	<0,0001	0,06	-22,3	28,7	-11,5	0,8628
Con Aplicación de Fungicidas	1	0,99	0,97	0,0055	1,67	0,3	9,5	1,1	0,9978
	2	0,87	0,79	<0,0001	1,39	69,3	87,5	-0,1	0,9462
	3	0,43	0,38	<0,0001	0,07	11,9	49,7	8,6	0,8772

Con los modelos desarrollados se logró estimar la infección de la enfermedad Sigatoka Negra para ambos tratamientos, con valores de predicción altos ( $R^2 > 0,65$ ) y significativos ( $p < 0,0001$ ), a partir del monitoreo molecular temprano del ADN de *P. fijiensis* cuantificado en la hoja 1 de la planta.

En palabras simples, considerando las variables climáticas (Cuadros 14 y 15) de la semana cuando la hoja posición 1 estuvo en estado de candela, es decir una semana antes de la cuantificación temprana del ADN de *P. fijiensis*, se logró estimar la infección (%) con al menos cuatro semanas de anticipación (4 SDM).

En la Figura 35 se muestran los valores estimados de la enfermedad (% infección) utilizando los modelos desarrollados en contraposición con los valores observados en el campo y aplicados cuando se inició el muestreo de hojas posición 1 en la semana 8 del 2018. Con los valores de las variables de clima de la semana anterior al muestreo para cuantificación del ADN (semana 7, 2018), se estimó de manera predictiva la infección de la semana 11 del 2018 (4 SDM).

Para el caso de la Figura 35A del tratamiento de plantas sin aplicación de fungicidas, se observa como los modelos predicen la infección (%) semanal y estos mostraron leves diferencias con la infección (%) observada en campo, donde los tres modelos presentaron buen ajuste ( $p>0,05$ ).



**Figura 35.** Comparación entre la infección real de Sigatoka Negra y la infección estimada por los modelos de regresión múltiple. **(A)** Tratamiento sin aplicación de fungicidas; **(B)** Tratamiento con aplicación de fungicidas. IMF= Inicio del muestreo foliar; VP= Valor de predicción. Río Frío, 2018.



Por otro lado, en la Figura 35B, en los tres modelos para el tratamiento de plantas con aplicación de fungicidas se observaron diferencias mínimas entre los valores de infección (%) estimados y los observados en campo, mostrando un buen ajuste de modelos ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, los primeros dos modelos presentaron valores predictivos altos ( $R^2 = 0,99$  y  $0,87$ ) y la tendencia de la estimación fue bien ajustada en la predicción de la infección (%) de Sigatoka Negra, conforme el monitoreo molecular temprano (cuantificación de ADN) de hojas posición 1 desde la semana 8 a la 23 del 2018.

#### **4.5.3. Modelos de predicción para la cantidad de ADN de *P. fijiensis* determinada en la hoja de la planta de banano**

En los resultados mostrados anteriormente se evidenció el buen ajuste (sesgo =  $\pm 2$  %) que presentaron los modelos de predicción temprana para la variable infección (% de área foliar necrosada) con al menos cuatro semanas de anticipación (4 SDM) a la aparición de los síntomas, momento cuando la hoja llegó a la posición cuatro o cinco dependiendo de la emisión foliar de las plantas. La predicción temprana de la infección (%) se logró con la utilización de las variables de clima, la cantidad de ADN del hongo y variables de crecimiento de las plantas.

Realizando el mismo proceso de modelación predictiva y con base en los resultados del Capítulo III, donde se encontraron relaciones aceptables entre la cantidad de ADN de *P. fijiensis* y las variables climáticas, se desarrolló una propuesta de modelos de predicción para la cantidad de ADN del hongo presente en la hoja posición 1, con la utilización de las condiciones climáticas cuando la hoja estuvo en su estado de hoja candela, es decir una semana antes de la cuantificación de ADN del patógeno.

Los resultados del Cuadro 17 corresponden a los modelos de regresión lineal múltiple para la estimación de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en la hoja posición 1 de plantas con y sin aplicación de fungicidas, donde las variables climáticas tuvieron correlaciones aceptables ( $r > 0,30$ ) y significativas ( $p < 0,0001$ ).

El modelo para el tratamiento sin aplicación de fungicidas presentó valores de predicción aceptables ( $R^2=0,73$ ;  $p<0,0001$ ), utilizando ocho variables con valores de estimación y correlación significativos ( $r$ ;  $p<0,05$ ) entre ellas la duración de la precipitación ( $r=0,60$ ), temperatura ( $r=0,38$ ), la duración y volumen de humedad foliar ( $r=0,39$ ), horas de luz ( $r=-0,69$ ), radiación solar ( $r=-0,52$ ) y el área de hoja evaluada ( $r=0,58$ ).

Para el caso del tratamiento con aplicación de fungicidas ( $R^2=0,55$ ;  $p<0,0001$ ) se afectaron las correlaciones ( $r$ ) y por lo tanto la variable de temperatura no fue significativa en el modelo de predicción de la cantidad del ADN de *P. fijiensis* para la hoja en posición 1 de la planta.

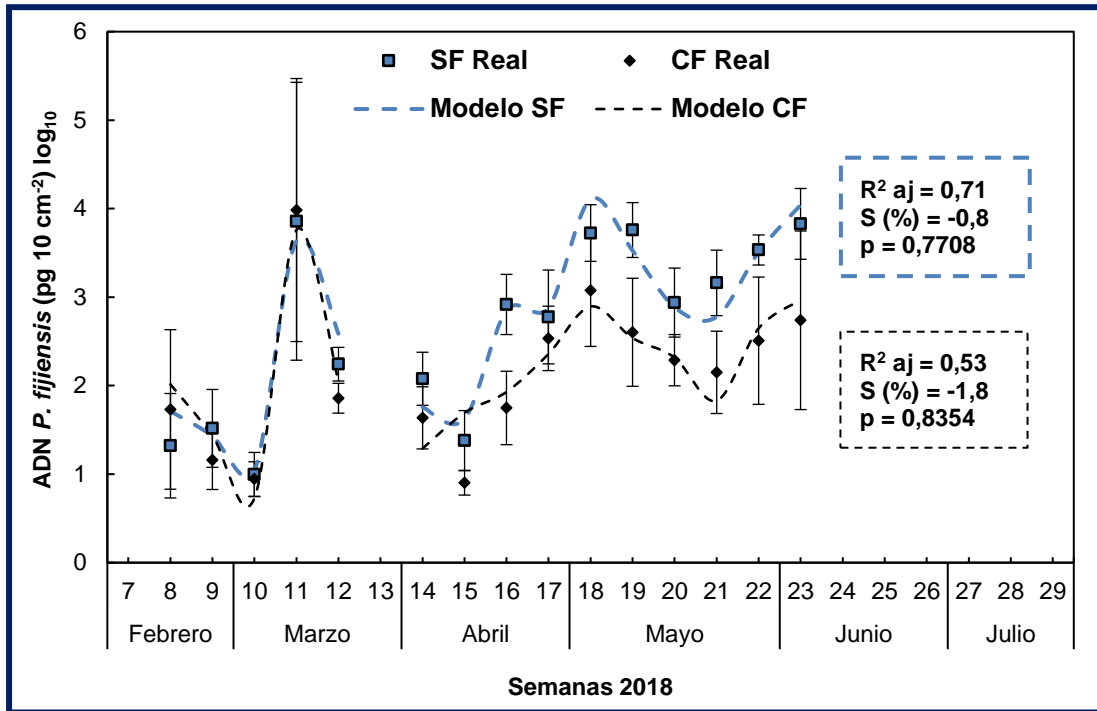
**Cuadro 17.** Modelos de regresión lineal múltiple para predicción de la cantidad del ADN de *P. fijiensis* en la hoja posición 1 de la planta de banano. Río Frío, 2018.

Modelos	ADN <i>P. fijiensis</i> (pg 10 cm <sup>2</sup> ) log <sub>10</sub>					
	Sin Aplicación de Fungicidas			Con Aplicación de Fungicidas		
	R <sup>2</sup> = 0,73 (p<0,0001)			R <sup>2</sup> = 0,55 (p<0,0001)		
Efecto	r (p-valor)	Estimador	P>T	r (p-valor)	Estimador	P>T
Intercepto	-	12,860	0,0040	-	5,8465	<0,0001
P (h)	0,60 (<0,0001)	0,1234	<0,0001	0,55 (<0,0001)	0,1374	<0,0001
Tp Máx (°C)	0,38 (<0,0001)	-0,7184	0,0015	0,09 (0,32161)	-	-
T Mín °C)	0,61 (<0,0001)	0,4728	<0,0001	0,29 (0,00063)	-	-
HF (h)	0,39 (<0,0001)	-0,4254	<0,0001	0,24 (0,00491)	-0,3130	<0,0001
HF (mm)	0,34 (<0,0001)	0,0414	<0,0001	0,19 (<0,0001)	0,0285	0,0001
Luz (h)	-0,69 (<0,0001)	-0,1824	<0,0001	-0,63 (<0,0001)	-0,1008	0,0001
Rs (W m <sup>-2</sup> )	-0,52 (<0,0001)	0,0000552	<0,0001	-0,55 (<0,0001)	0,0000178	0,0834
AHE (cm)	0,58 (<0,0001)	0,0511	<0,0001	0,27 (0,00152)	0,0123	0,0773

P=Precipitación; Tp Máx=Temperatura Promedio Máxima; T Mín=Temperatura Mínima; HF=Humedad Foliar; Rs=Radiación Solar; AHE=Área de Hoja Evaluada

Las tendencias en la modelación y el ajuste de la misma se observan en la Figura 36, con la validación de los modelos donde no se encontró diferencias significativas entre la cantidad real del ADN de *P. fijiensis* y la estimada por los modelos para los tratamientos sin aplicación de fungicidas ( $p=0,7708$ ) y con aplicación de fungicidas ( $p=0,8354$ ).

El buen ajuste en los modelos de predicción de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* se evidenció en los resultados obtenidos en el análisis del sesgo (%), presentando valores aceptables dentro del rango  $\pm 2$  % y valores de predicción aceptables ( $R^2$ ) para los tratamientos del estudiado (SF=-0,8 % y CF=-1,8 %).



**Figura 36.** Comparación entre la cantidad real del ADN de *P. fijiensis* y la estimada utilizando modelos de regresión lineal múltiple para la hoja posición 1 de la planta de banano. **SF**= Tratamiento sin aplicación de fungicidas; **CF**= Tratamiento con aplicación de fungicidas; **R<sup>2</sup> aj**= R<sup>2</sup> ajustado; **S (%)**= Sesgo; **p**= probabilidad de Wilcoxon. Río Frío, 2018.

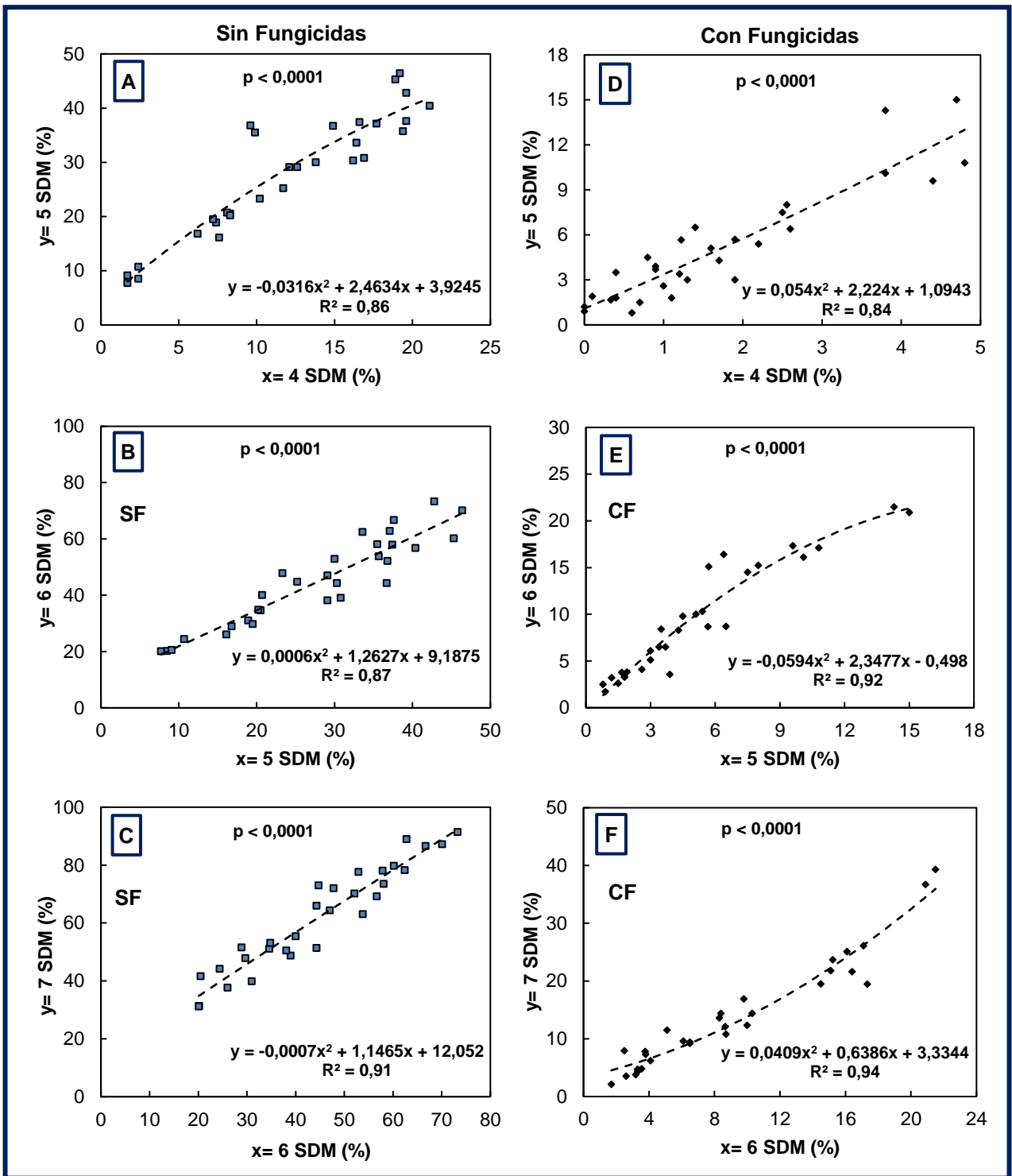
#### 4.5.4. Estimación del comportamiento semanal de la infección de Sigatoka Negra según el cambio de posición de la hoja en la planta de banano

Se encontraron correlaciones lineales altas ( $r > 0,65$ ) y significativas ( $p < 0,001$ ) entre la infección (%) evaluada visualmente a 4 SDM con las de 5, 6 y 7 SDM (Cuadro 13). Los valores de infección semanal en la misma hoja presentaron una tendencia creciente y por lo cual la modelación por medio de regresiones no lineales, como la polinomial.

El esfuerzo realizado en esta investigación fue desarrollar modelos de predicción temprana de la infección (%) cuatro semanas antes de la aparición de síntomas (4 SDM). Sin embargo, según los resultados mostrados en esta sección, se realizó una propuesta de modelos simples para estimar el comportamiento de la variable infección (%) en la misma hoja durante las siete semanas de evaluación visual para los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas.

En la Figura 37 se muestran las regresiones para modelar el avance de la infección en una hoja a partir de la predicción de la infección 4 SDM (%) por medio de los modelos de regresión múltiple (Cuadro 14 y 15) se utiliza ese valor de infección en las regresiones de las Figuras 37A y 37D para predecir la infección a la 5 SDM ( $R^2=0,86$  y  $0,84$ ), posteriormente se debe ingresar ese valor en las regresiones de las Figuras 37B y 37E para estimar la infección de la 6 SDM ( $R^2=0,87$  y  $0,92$ ) y por última instancia se estima la infección que presentó una hoja hasta la 7 SDM (Figuras 37C y 37F), donde las regresiones presentaron valores de  $R^2$  altos ( $0,91$  y  $0,94$ ) y significativos ( $p<0,0001$ ) para los tratamientos del estudio (SF y CF). Para lo anterior, se utilizó el valor real (observado) de infección temprana 4 SDM (%) y se modeló los siguientes valores de infección obtenidos en 5, 6 y 7 SDM (%) utilizando las ecuaciones mostradas en la Figura 37.

La idea de esta propuesta es utilizar los modelos de predicción temprana para estimar la infección a 4 SDM (%) utilizando variables de clima, ADN y crecimiento; y paralelamente utilizar ese valor en la estimación de la infección a 5 SDM (%) y así hasta la infección de la hoja a 7 SDM (%), tal y como se ilustra en la Figura 37 para los tratamientos con y sin aplicación de fungicidas.



**Figura 37.** Regresión polinomial para la estimación de la infección (%) de Sigatoka Negra a 5, 6 y 7 SDM mediante el valor de predicción temprana de la infección 4 SDM (%) en plantas de banano. **SF**= Tratamiento sin aplicación de fungicidas (A, B y C); **CF**= Tratamiento con aplicación de fungicidas; **SDM**= Semanas después de muestreo (E, F y G). Río Frío, 2018.

## 4.6. DISCUSIÓN

Los modelos de predicción en fitopatología se basan en la determinación de variables de clima en el momento de la germinación e invasión del patógeno al hospedero. Si a eso se le adiciona la medición de los eventos efectivos de infección y hay correlación con el posterior desarrollo de síntomas de la enfermedad, entonces efectivamente se pueden desarrollar modelos de predicción. Al final el objetivo de los modelos epidemiológicos es la unión de la fitopatología y estadística para hacer una modelación predictiva de los daños causados por los patógenos en las plantas de importancia agrícola (Muñoz 2019).

Las herramientas matemáticas como la monomolecular, exponencial, logística y Gomperts son comúnmente utilizadas para el entendimiento de la epidemiología de las enfermedades en plantas (Contreras-Medina *et al.* 2009). No obstante, la mayoría de los modelos de infección desarrollados utilizan ecuaciones de regresión en su mayoría basadas en polinomios, ecuaciones logísticas y complejos tri-dimensionales (Magarey *et al.* 2006, Contreras-Medina *et al.* 2009). Para el caso de esta investigación para la enfermedad Sigatoka Negra se utilizó análisis de regresión lineal y polinomial, debido a las correlaciones lineales encontradas entre las variables de infección y las variables climáticas, cantidad de ADN de *P. fijiensis* y del crecimiento de la planta, no obstante, también por la facilidad en el proceso de análisis y la no complejidad para la utilización de los modelos a nivel de campo.

Señalan Magarey *et al.* (2006) que las variables de la duración de humedad foliar, humedad relativa y temperaturas óptimas para el patógeno son determinantes en los procesos de los patógenos y por ende los modelos son ajustados satisfactoriamente integrando suficientes variables ambientales que estén estrechamente relacionadas con la enfermedad. Los modelos de predicción desarrollados en la presente investigación para la enfermedad Sigatoka Negra utilizan al menos ocho variables regresoras entre ellas climáticas, cantidad de inóculo y de crecimiento de la planta. Los datos indican que las condiciones climáticas cuando la hoja estuvo en su estado de candela fueron las primordiales

para el proceso infectivo del patógeno, debido a la disminución en las correlaciones durante las cuatro semanas de evaluación de la hoja. Una de las ventajas que tienen los modelos que estiman las curvas de progreso de enfermedades es que dos, tres o más variables normalmente describen satisfactoriamente la dinámica de la enfermedad en un tiempo determinado y, por otro lado, que los modelos contribuyen en el desarrollo de mejores estrategias de manejo de las enfermedades y un eficiente uso de los fungicidas (Contreras-Medina *et al.* 2009).

Mediante estas herramientas matemáticas ya mencionadas se han desarrollado diferentes tipos de modelos que consideran las variables que limitan y favorecen la capacidad infectiva de patógenos foliares de plantas como el inóculo inicial, área de hoja afectada, temperatura del aire, precipitación, humedad relativa, duración de la humedad foliar, velocidad del viento, entre otras, para la predicción de enfermedades importantes como *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Mycosphaerella pinodes*, *Puccinia recondita*, *Plasmora vitícola*, *Podosphaera leucotricha*, *Septoria tritici*, *Venturia pirina* y otros patógenos de importancia agrícola (Coakley *et al.* 1985, Magarey *et al.* 2006, Contreras-Medina *et al.* 2009).

Para el caso de la enfermedad Sigatoka Negra, Arnerson (1989) desarrolló modelos de pronósticos biológicos para determinar el estado de evolución de la enfermedad (EE), utilizando parámetros ambientales para la predicción del momento del control de la enfermedad con una aplicación estratégica del fungicidas (Fouré y Ganry 2008), sin embargo, este sistema perdió vigencia por la resistencia a fungicidas por parte del patógeno *Pseudocercospora fijiensis*, causante de la Sigatoka Negra en plantas de banano (Romero 1996). Por lo anterior, a partir de la década del 90 en las plantaciones se utilizan los pronósticos climáticos de precipitación y temperatura óptimas para el hongo, así como parámetros complementarios de la incidencia/severidad como el promedio ponderado de infección (PPI), severidad de la enfermedad (SE), hoja más joven manchada (HMJM) y la hoja más joven con estrías (HMJE) para determinar el momento del uso de fungicidas protectantes y sistémicos que disminuyan los daños foliares

causados por Sigatoka Negra en las plantaciones de banano (Ganry y Meyer 1972ab, Bureau 1989, Gauhl 1989, Gauhl y Pasberg 1994, Fouré y Ganry 2008, de Lapayre de Bellaire *et al.* 2010, Ganry *et al.* 2012). Sin embargo, se debe considerar que se toman decisiones del manejo de la enfermedad con parámetros de daños ya causados en las hojas, por la limitante de ser una evaluación visual de síntomas y de ahí la importancia en la detección y cuantificación temprana del ADN del hongo, y su utilización en los modelos de predicción temprana desarrollados en esta investigación para la enfermedad Sigatoka Negra.

Los resultados obtenidos en esta investigación de la cuantificación del ADN de *P. fijiensis* indican que fue posible la detección y cuantificación temprana del hongo en el tejido foliar (hoja posición 1) y su relación directa con los posteriores síntomas en la hoja, esto permitió generar modelos de predicción bien ajustados para la variable infección (% área foliar necrosada). Burt *et al.* (1999) indicó que una de las variables de importancia en los modelos de la severidad/incidencia de enfermedades es la cuantificación del inóculo en el ambiente o el inóculo efectivo en la hoja de la planta, para ello Meredith y colaboradores (1973) determinaron la concentración (%) ambiental de las ascosporas mediante trampas de esporas y encontraron que la concentración de ascosporas crece en función de la humedad relativa y temperaturas del aire entre 20 °C y 24 °C, con fluctuaciones en un lapso de 24 horas y diferencias en días secos y lluviosos. Por lo anterior, las fluctuaciones en la cantidad de ADN del hongo se debieron al factor inóculo y climático.

Por otro lado, Burt *et al.* (1999) determinaron modelos lineales para la estimación de las ascosporas liberadas al ambiente, a partir del área de tejido necrosado con el objetivo de utilizarlos como valores de alertas en las plantaciones de banano en Costa Rica. Sin embargo, estas herramientas son difíciles de manejar bajo condiciones de campo. Por lo cual, la base de esta investigación fue la alternativa de uso de la herramienta de biología molecular como el qPCR, que mediante las curvas estándar permiten la cuantificación de la cantidad de ADN del patógeno *P. fijiensis* en una hoja de banano con síntomas tempranos (Arzanlou *et al.* 2007). Este valor se interpreta como el crecimiento del hongo en un tiempo



determinado (inóculo efectivo) y para el caso de esta investigación el crecimiento infectivo del hongo fue desde la hoja candela hasta el momento cuando la hoja llegó a la posición 1 en la planta.

Los resultados indican que el valor de cantidad de ADN del patógeno obtuvo un peso significativo en los modelos de predicción para la enfermedad Sigatoka Negra. Donde, el objetivo principal de la investigación fue desarrollar modelos de predicción para la infección (%) de Sigatoka Negra, sin embargo, como se encontraron correlaciones aceptables entre las variables de clima y la cantidad de ADN del hongo, se utilizaron en los modelos las variables de duración de lluvia, temperatura promedio, humedad relativa y radiación solar. Los modelos desarrollados tuvieron valores aceptables y significativos de ajuste ( $S=\pm 2\%$ ) para predecir la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en una hoja que estuvo expuesta a las condiciones primordiales para los procesos de la liberación de ascosporas, germinación e infección inicial (Churchill 2011) y por lo tanto se podrá aplicar estos modelos para generar alertas en las plantaciones de banano, en cuanto nivel de inóculo efectivo en las hojas.

En referencia al uso principal de los valores de la cantidad de ADN en los modelos predictivos de la infección (%) fue significativo, para ello se integraron variables de clima y la de estimación del inóculo (ADN) con herramientas estadísticas para generar y validar modelos de predicción temprana del nivel de infección (%) de la enfermedad Sigatoka Negra. Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de los modelos desarrollados para esta investigación fueron altos ( $R^2 > 0,65$ ) y significativos ( $p < 0,0001$ ), donde las variables de crecimiento, ADN de *P. fijiensis*, precipitación, temperaturas, humedad relativa, humedad foliar y radiación solar, tuvieron un peso importante en la predicción de la dinámica o comportamiento de los síntomas de la enfermedad y principalmente por ser las condiciones climáticas que ocurrieron durante el desarrollo de la hoja candela.

Los resultados de los modelos obtenidos en la investigación son válidos y comparables a los reportados en la literatura (Cuadro 1), en cuanto a la capacidad

de predicción ( $R^2$ ) para variables de incidencia y severidad de la enfermedad Sigatoka Negra. Donde Chuang y Jeger (1985) lograron desarrollar un modelo de predicción para la tasa de progreso de la Sigatoka Negra en Taiwán, los valores de predicción fueron aceptables ( $R^2=0,83$ ), integrando variables previas de la incidencia de la enfermedad ( $A_1=Z_1^2$ ), la precipitación acumulada en las semanas anteriores a los síntomas visuales de la enfermedad y la cantidad de días con humedad relativa mayor a 90 % ( $I_{16}$ ). Los autores validaron el modelo en tres localidades y entre los años de 1980 a 1984, obteniendo un  $R^2$  con aceptable capacidad de predicción ( $R^2>0,65$ ). Por otro lado, Jácome y Schuh (1992), a nivel de laboratorio, desarrollaron modelos donde las infecciones se desarrollaban en un ámbito óptimo de temperaturas entre 25 °C y 28 °C, con 18 horas como período de mojadura de la hoja, condiciones importantes para las ascosporas. Relacionado a los procesos de infección, por su parte, Porras y Pérez (1993) en Cuba, desarrollaron un modelo para estimar las constantes de velocidad de crecimiento ( $V_f$ ) de los tubos germinativos de *P. fijiensis* en función de las temperaturas en condiciones de laboratorio ( $R^2=0,91$ ). Los mismos autores determinaron por medio de datos meteorológicos ecuaciones para estimar la suma de velocidades de evolución ( $SV$ ) para *M. musicola* ( $R^2=0,99$ ) y *P. fijiensis* ( $R^2=0,99$ ) en función de las temperaturas máximas y mínimas diarias. Lo cual explica las fluctuaciones semanales encontradas en los valores de infección (%) en hojas expuestas a diferentes condiciones climáticas y de cantidad de inóculo.

Sin embargo, considerando lo anteriormente mencionado, a nivel de campo el monitoreo de la enfermedad se basa en variables como posición de hoja más joven enferma, generalmente con estría, y la hoja más joven manchada, aunque como se ha indicado anteriormente, representan una evaluación tardía del estado y nivel de infección en las plantas y a pesar de ello estas evaluaciones resultan efectivas para la toma de decisiones sobre las aplicaciones de fungicidas (frecuencia, tipo y dosis) en las plantaciones de banano, no obstante el uso de modelos de predicción puede mejorar la estrategia y costos del uso de fungicidas.

Los modelos predicen el porcentaje de área foliar necrosada (infección) con al menos cuatro semanas de anticipación (4 SDM), utilizando las variables regresoras de clima, ADN y crecimiento de la planta; lo cual indica la cantidad de semanas que tardan en reflejarse los síntomas visibles de estrías y manchas en la hoja, o comúnmente denominado periodo de incubación (Murillo 2015). Por lo anterior en Costa Rica, Romero y Sutton (1995ab) desarrollaron modelos de predicción para el período de incubación ( $R^2=0,70$ ) y latencia ( $R^2=0,80$ ) de la Sigatoka Negra en ensayos establecidos a nivel de campo en ausencia de aplicaciones de fungicidas (condiciones naturales), obteniendo modelos con una precisión y exactitud aceptable, integrando variables de clima. Los mismos modelos fueron valorados y validados a nivel de campo. Igualmente, en Costa Rica, para estimar el nivel de inóculo en el ambiente, Burt *et al.* (1999), determinaron modelos para cuantificar el número de peritecios presentes en áreas necróticas de las hojas infectadas por Sigatoka Negra ( $R^2=0,88$ ;  $0,99$ ) logrando establecer una ecuación para estimar la cantidad de inóculo (ascosporas) causada por la esporulación de los peritecios presentes en las áreas necróticas de las hojas ( $R^2=0,99$ ). Este valor en conjunto con la cantidad estimada del ADN del hongo se podría utilizar como valores de alerta temprana.

En otras latitudes como Venezuela, Hernández *et al.* (2005) en plantaciones de plátano sin combate químico, desarrollaron ecuaciones para predecir el promedio ponderado de infección (PPI) con un nivel de predicción muy bajo ( $R^2=0,33$ ); no obstante, lo valioso es la metodología utilizada considerando valores acumulados de seis semanas consecutivas y previas a la evaluación de la severidad e integrando las variables de lluvia, nubosidad, evaporación, temperatura mínima y humedad relativa. Por otro lado, Freitez (2007) en su estudio en plantaciones de plátano al sur del Lago de Maracaibo, propuso modelos para la predicción de la hoja más joven manchada ( $R^2=0,71$ ) y las severidades de la enfermedad para la época seca ( $R^2=0,79$ ) y lluviosa ( $R^2=0,73$ ); determinando que las variables humedad relativa, precipitación, radiación solar, velocidad del viento, temperatura y evapotranspiración definen la dinámica de la enfermedad en esa localidad en

específico, consideraron las variables de clima en amplitud de ventana y días de retardo con respecto a la medición de las variables biológicas de la enfermedad Sigatoka Negra (Freitez *et al.* 2009). Igualmente, en Venezuela, Hernández *et al.* (2009) establecieron un ensayo para el desarrollo de modelos de predicción de Sigatoka Negra en plátano bajo diferentes condiciones de fertilización del suelo (N, P, K) y determinaron un modelo ( $R^2=0,71$ ) para predecir la variable biológica del PPI y donde el comportamiento de la severidad estuvo influenciado por los parámetros de la nubosidad y la insolación.

Ochoa *et al.* (2016) en Colombia desarrollaron un modelo estocástico para el pronóstico de la enfermedad Sigatoka Negra, para la variable de predicción PPI con la integración de las variables de hoja más joven infectada, hoja más joven con estrías y la precipitación, como una herramienta de soporte en el campo para el manejo de la enfermedad, mediante el uso de fungicidas aplicados estratégicamente. Recientemente Gómez (2017) en la región de Urabá, Antioquía (Colombia), desarrolló modelos de predicción para la hoja más joven enferma y para el estado de evolución de la enfermedad ( $R^2=0,95$ ), obteniendo aceptables valores de predicción ( $R^2=0,72$ ) para plantaciones de banano en diferentes fincas de la región, donde las variables de clima de mayor correlación fueron ( $r>0,65$ ) la humedad relativa mínima, humedad relativa promedio, temperatura promedio, precipitación acumulada y el brillo solar promedio, mismas que definieron la dinámica de la enfermedad Sigatoka Negra, tal y como se mostró en los resultados de la presente investigación.

En referencia al uso de otras alternativas tecnológicas como el uso de aeronaves no tripuladas (drones), para detectar enfermedades por medio de sensores multiespectrales y mediante técnicas geoestadísticas se han utilizado para el monitoreo espacial de la enfermedad Sigatoka Negra, por su parte Gómez-Correa *et al.* 2017 logró modelar la variable biológica de la hoja más joven manchada (HMJM) mediante modelación espacial con sistemas de información geográficas, esta variable es utilizada comúnmente como un indicador del nivel de daño de Sigatoka Negra en la plantación. Por otro lado, la utilización de aeronaves no

tripuladas con sistemas de detección temprana puede contribuir en el pronóstico de las enfermedades en las plantaciones de banano y lo mismo se esperaría con los sistemas de imágenes multiespectrales (Cuevas 2015, Ochoa *et al.* 2016, Pham *et al.* 2018).

Como se ha demostrado en el Cuadro 1 y en los párrafos anteriores, los modelos de predicción de la enfermedad Sigatoka Negra hasta el presente contemplan el uso de la variable inóculo. Por lo tanto, se considera un aporte de este estudio el uso de la variable de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* presente en la hoja posición 1 en los modelos de predicción temprana de Sigatoka Negra y el potencial en la utilización de modelos de predicción de la cantidad de ADN del hongo a partir de las condiciones climáticas, lo anterior se considera una alternativa económica para estimar el crecimiento del hongo en la hoja posición 1 (pg ADN) de la planta de banano y su eventual utilización como valores de alerta temprana.

Este aporte da una alternativa más para el entendimiento y futuro combate de la enfermedad mediante el uso de fungicidas, Hernández-Mansilla *et al.* (2016) pronostican que el cambio climático está provocando incrementos progresivos de la evolución de la enfermedad Sigatoka Negra y causará incrementos en el número de tratamientos químicos y el costo fitosanitario, no obstante, recalcan la necesidad de trabajar en nuevas medidas de manejo integrado de la enfermedad Sigatoka Negra en las diferentes regiones donde se cultiva y se comercializa el cultivo de banano.

#### 4.7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que:

Las condiciones climáticas de precipitación, temperatura, humedad relativa, humedad foliar y radiación solar al momento cuando la hoja estuvo en su estado candela tienen una relación directa y significativa con el comportamiento de la enfermedad Sigatoka Negra tanto en la cantidad de ADN del patógeno como en la variable de infección (% área foliar necrosada).

Los valores de la cantidad de ADN de *P. fijiensis* tienen una relación directa y significativa con las fluctuaciones de la variable de infección (%) en el tratamiento sin aplicación de fungicidas, mientras la aplicación de fungicidas afecta las relaciones entre las variables ADN e infección, debido al efecto del fungicida sobre los procesos infectivos del patógeno en la hoja, así como en las variables de clima y crecimiento de la planta.

El crecimiento del área de hoja evaluada y la circunferencia de la planta tienen una relación directa con la variable de infección (%) de la enfermedad y la cantidad de ADN de *P. fijiensis*, lo que indica que se favorecen los eventos exitosos de infección de las ascosporas y conidios en función del crecimiento de las plantas.

Por medio del análisis de componentes principales (ACP) se determina que al menos 19 variables del grupo de datos del estudio aportan una alta variabilidad explicada, al presentar una correlación cofenética del 95 % y se logra discriminar variables que no aportaban significancia en el análisis para desarrollar los modelos de predicción temprana de la infección (%) de Sigatoka Negra.

Los modelos de predicción temprana presentan valores altos de predicción ( $R^2 > 0,65$ ;  $p < 0,05$ ), con un buen ajuste en la validación ( $S = \pm 2$  %;  $p > 0,05$ ) y funcionan bajo la metodología de análisis utilizada en esta investigación para estimar la infección (%) de la enfermedad Sigatoka Negra con una anticipación de tiempo de al menos cuatro semanas (4 SDM) a la aparición de los síntomas visuales.

La propuesta de modelos para estimar el comportamiento de la infección (%) en la misma hoja a la 5 SDM, 6 SDM y 7 SDM permite una proyección de la evolución de los síntomas de Sigatoka Negra y abre la posibilidad de tomar decisiones en cuanto a la estrategia del uso de los fungicidas.

La variable de cuantificación del ADN de *P. fijiensis* mediante qPCR evidencia la importancia de la determinación e inclusión de la variable inóculo en los modelos de predicción temprana de la enfermedad Sigatoka Negra y abre toda una nueva posibilidad de investigación sobre esta variable (ADN) en estudios epidemiológicos de Sigatoka Negra.

La propuesta de modelos ajustados y con capacidad predictiva para la cantidad de ADN de *P. fijiensis* utilizando los valores de las condiciones climáticas favorables para el hongo, da una alternativa para estimar los eventos efectivos de ascosporas y conidios en la hoja candela, y utilizar estos valores como alertas ante eventos climáticos favorables para la enfermedad Sigatoka Negra, así como contribuir en la utilización oportuna de fungicidas a nivel de campo.

#### **4.8. RECOMENDACIONES**

Con base en los resultados obtenidos, se recomienda:

Realizar una validación de los modelos de predicción temprana en áreas de producción comercial y valorar su aplicabilidad para la toma de decisiones en cuanto a la aplicación estratégica de fungicidas sistémicos, en diferentes zonas de producción de banano del Caribe de Costa Rica. Así como validar los modelos predictivos recopilados de la literatura y comparar la precisión bajo las condiciones climáticas de Costa Rica.

Desarrollar modelos predictivos con la misma metodología de esta investigación para la estimación de otras variables como la hoja más joven con estrías, hoja más joven manchada y otras comúnmente utilizadas en la industria bananera, así como también implementar otras herramientas estadísticas que permitan un análisis más robusto en la creación de modelos predictivos.



#### 4.9. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. 5th ed. LIMUSA. Florida, USA. 1936 p.
- Arneson, PA. 1989. A mechanistic computer simulation model of Sigatoka. Pag. 167-171. *In* International network INIBAP, Sigatoka leaf spot disease of bananas. San José, CR.
- Arzanlou, M; Abeln, ECA; Kema, GHJ; Waalwijk, C; Carlier, J; De Vries, I; Guzmán, M; Crous, PW. 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology* 97(9):1112-1118.
- Bureau, E. 1989. Adaptation a forecasting system to control Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in a traditional plantain small holding in Panama. Pag. 115-123. *In* International network INIBAP, Sigatoka leaf spot disease of bananas. San José, CR.
- Burt, PJA; Rosenberg, LJ; Rutter, J; Ramirez, F; Gonzalez, H. 1999. Forecasting the airborne spread of *Mycosphaerella fijiensis*, a cause of black Sigatoka on banana: estimations of numbers of perithecia and ascospores. *Ann. Appl. Biol* 135:369-377.
- Coakley, SM; McDaniel, LR; Shaner, G. 1985. Model for predicting severity of *Septoria tritici* blotch on winter wheat. *Phytopathology* 75(11):1245-1251.
- Contreras-Medina, LM; Torres-Pacheco, I; Guevara-González, RG; Romero-Troncoso, RJ; Terol-Villalobos, IR; Osornio-Ríos, RA. 2009. Mathematical modeling tendencies in plant pathology. *African Journal of Biotechnology* 8(25):7399-7408.
- Cuevas Gutiérrez, J. 2015. Sistema de adquisición y análisis de información para el diagnóstico de Sigatoka Negra. Tesis MSc. Colima, Colombia. UC. 78 p.
- Chuang, TY; Jeger, MJ. 1987. Predicting the rate of development of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*) disease in southern Taiwan. *Phytopathology* 77:1542-1547.

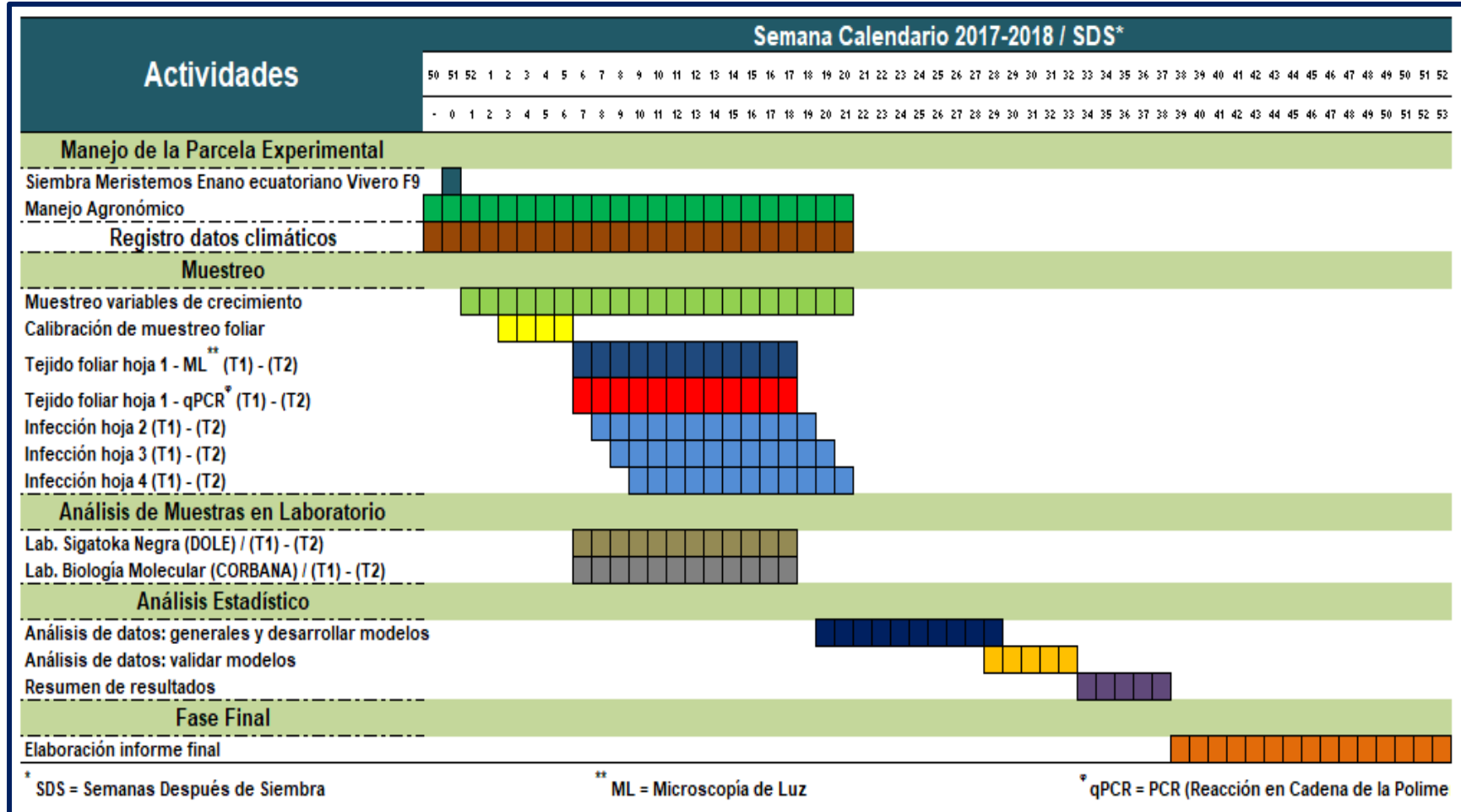
- de Lapayre de Bellaire, L; Fouré, E; Abadie, C; Carlier, J. 2010. Black leaf streak disease is challenging the banana industry. *Fruits* 65(6):327-342.
- Di Rienzo J; Casanoves F; Balzarini M; González L; Tablada M; Robledo C. 2018. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, AR. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Fouré, E; Ganry, J. 2008. A biological forecasting system to control Black Leaf Streak disease of bananas and plantains. *Fruits* 63:311-317.
- Freitez, JA. 2007. Desarrollo de un modelo predictivo del brote de la Sigatoka Negra para las plantaciones de plátano al sur del lago de Maracaibo. Tesis MSc. Mérida, Venezuela, Universidad de los Andes. 124 p.
- Freitez, JA; Ablan, M; Gómez, C. 2009. Propuesta de modelos predictivos del brote de la Sigatoka Negra para las plantaciones de plátano al sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. *UDO Agrícola* 9(1):191-198.
- Ganry, J; Meyer, JP. 1972a. La lutte contrôlée contre le *cercospora* aux Antilles. 1- Bases climatiques de l'avertissement. *Fruits* 27:665-676.
- \_\_\_\_\_. 1972b. La lutte contrôlée contre le *Cercospora* aux Antilles. Technique d'observation et de numérotation de la maladie. *Fruits* 27:767-774.
- Gauhl, F. 1989. Epidemiología y ecología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (*Musa* sp.) en Costa Rica. Unión de Países Exportadores de Banano (Upeb), Ciudad de Panamá (Panamá). 114 p.
- Gauhl, F; Pasberg-Gauhl, C. 1994. Epidemiology of Black Sigatoka disease on plantain in Nigeria. *Phytopathology* 84 (10):1080.
- Ganry, J; Fouré, E; de Lapayre de Bellaire, L; Lescot, T. 2012. An Integrated Approach to Control the Black Leaf Streak Disease (BLSD) of Bananas, while reducing fungicide use and environmental impact. 35 p.
- Gómez Correa, JC. 2017. Desarrollo de modelos predictivos de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet) en banano para la región de Urabá, Antioquia - Colombia. Tesis MSc. Medellín, Colombia. UNC. 116 p.

- Gómez-Correa, JC. Torres-Aponte, WS; Cayón-Salinas, DG; Hoyos-Carvajal, LM; Castañeda-Sánchez, DA. 2017. Modelación espacial de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet) en banano cv. Gran Enano. Revista Ceres Vicosa 64(1):047-054.
- Hernández, L; Hidalgo, W; Linares, B; Hernández, J; Romero, N; Fernández, S. 2005. Estudio preliminar de vigilancia y pronóstico para Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el cultivo de plátano (*Musa* AAB cv Hartón) en Macagua-Jurimiquire, estado Yaracuy. Revista Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia 22(4):325-339.
- Hernández, J; Sanabria, N; Blanco, G; Linares, B; Milla, M; Pérez, A. 2009. Predicción de Sigatoka Negra en “Plátano Hartón” bajo condiciones de fertilización del suelo en el municipio Veroes del estado Yaracuy, Venezuela. Agronomía Tropical 59(3):317-322.
- Hernández-Mansilla, AA; Sorí-Gómez, R; Valentín-Pérez, Y; López-Mayea, A; Córdova-García, O; Benedico-Rodríguez, O. 2016. Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y seguridad alimentaria. Escenarios bioclimáticos en bananos bajo efecto del cambio climático en Ciego de Ávila, Cuba. Journal of the Selva Andina Biosph 4(2): 59-70.
- Jácome, LH; Schuh, W. 1992. Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Phytopathology 82:515-520.
- Magarey, RD; Sutton, TB; Thayer, CL. 2006. A simple generic infection model for foliar fungal plant pathogens. Phytopathology 95(1):92-100.
- Meredith, DS; Lawrence, JS; Firman, ID. 1973. Ascospore release and dispersal in black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*). Transactions British Mycological Society 60(3):547-554.
- Murillo Salas, JE. 2015. Efecto de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la eficacia biológica de fungicidas sistémicos utilizados contra la Sigatoka Negra. Tesis Lic. San Carlos, CR, TEC. 176p.

- Muñoz, M. 26 ene. 2019. Observaciones sobre la importancia de los modelos de predicción temprana de enfermedades (correo electrónico). Heredia, Costa Rica, DOLE: Standard Fruit Company S.A.
- Ochoa, D. Cevallos, J; Vargas, G; Criollo, R; Romero, D; Castro, R; Bayona, O. 2016. Hyperspectral imaging system for disease scanning on banana plants. Proc. of SPIE 9864(1).
- Ochoa, A; Abauza, F; Rey, V. 2016. Forecasting black sigatoka in banana crops with stochastic models. *In VI International Banana Congress CORBANA*. Miami, USA.
- Porras, A; Pérez, L. 1993. Método para el cálculo de las sumas de velocidades de desarrollo para el pronóstico bioclimático de los tratamientos contra Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y amarilla (*M. musicola* Leach ex Mulder) a partir de la temperatura máxima y mínima diaria. *In VII Fórum de Ciencia y Técnica*. La Habana, Cuba.
- Pham, H; Lim, Y; Gardi, A; Sabatini, R; Pang, E. 2018. A novel bistatic lidar system early-detection of plant diseases form unmanned aircraft. *In Proceedings of the 31th Congress of the International Council of the Aeronautical Sciences (ICAS 2018)*. Belo Horizonte, Brazil. ISBN: 9783932182884.
- Romero, RA; Sutton TB. 1995a. Dynamics of fungicide-resistant populations of *Mycosphaerella fijiensis* and epidemiology of black Sigatoka of bananas. PhD thesis. Department of Plant Pathology, NCSU, Raleigh. 113 p.
- \_\_\_\_\_. 1995b. Modelos para predecir la duración del período de incubación y latencia de la Sigatoka Negra del banano. Pag. 50-52. *In Informe anual 1995*. Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- Romero, RA. 1996. Avances en epidemiología y manejo de la Sigatoka Negra del banano. *In X Congreso Nacional Agronómico/III Congreso de Fitopatología*. Dirección de Investigaciones Agrícolas CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.

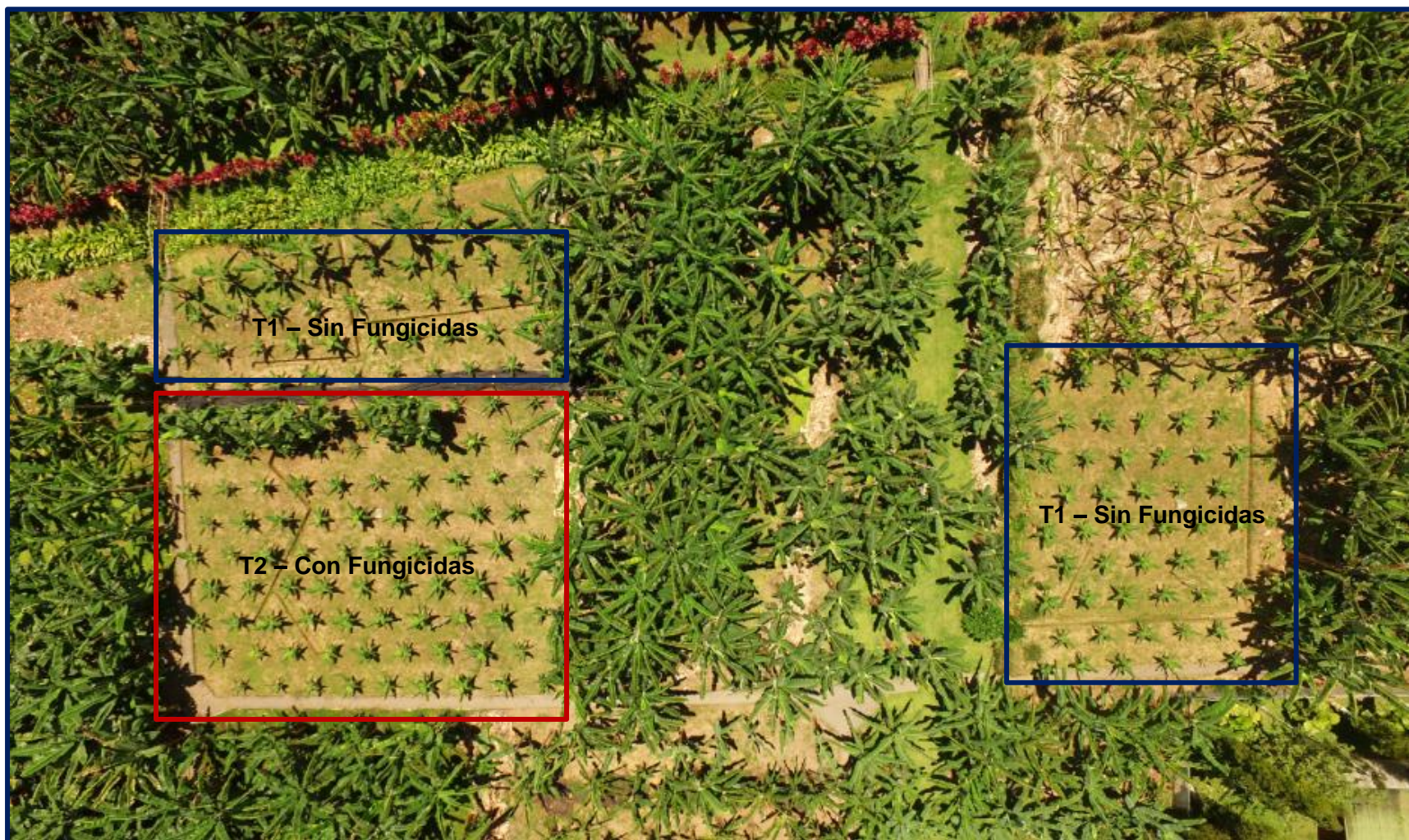
## ANEXOS

**Anexos 1.** Cronograma de actividades de la ejecución del experimento en Río Frío, 2018.

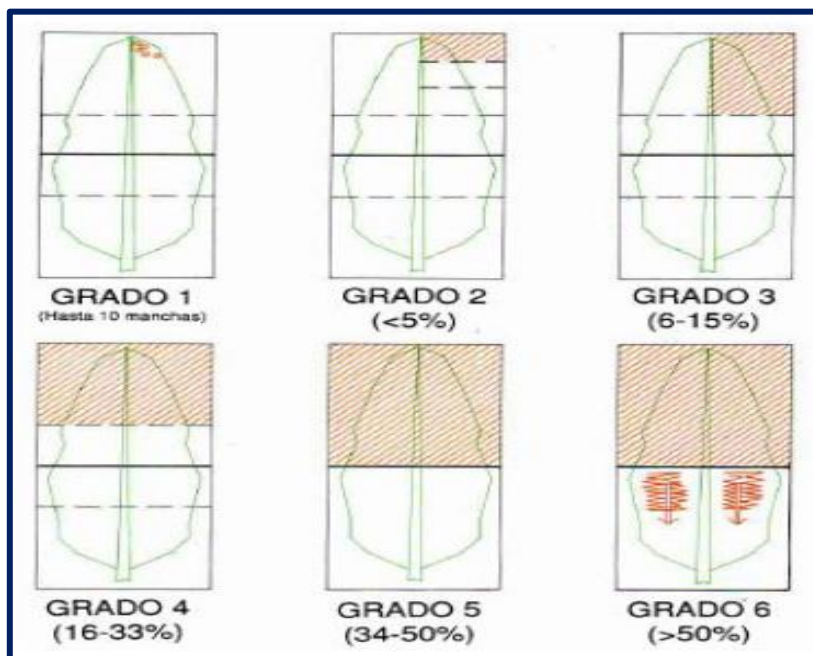




**Anexos 2.** Imagen aérea del experimento tomadas con un Drone por el Ing. Hubert Gutiérrez (DOLE), momento en que las plantas tenían 10 semanas de edad. Río Frío, 2018.



**Anexos 3.** Escala de Stover modificada por Gauhl (1989) para la evaluación de la incidencia y severidad de Sigatoka Negra en Musáceas.



**Anexos 4.** Sistema de calificación de la severidad de Sigatoka Negra en Musáceas.  
Fuente: Freitez (2007).

