

**EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y DE
COMPUESTOS INORGÁNICOS Y ORGÁNICOS SOBRE LA
ESPORULACIÓN DE LESIONES DE SIGATOKA NEGRA
(*Mycosphaerella fijiensis*)**



MAUREN LISETH GÓMEZ RUIZ



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

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
SEDE REGIONAL SAN CARLOS**

2013

**EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y DE
COMPUESTOS INORGÁNICOS Y ORGÁNICOS SOBRE LA
ESPORULACIÓN DE LESIONES DE SIGATOKA NEGRA
(*Mycosphaerella fijiensis*)**

MAUREN LISETH GÓMEZ RUIZ

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Agronomía
para obtener el grado Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
SEDE REGIONAL SAN CARLOS**

2013

**EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y DE
COMPUESTOS INORGÁNICOS Y ORGÁNICOS SOBRE LA
ESPORULACIÓN DE LESIONES DE SIGATOKA NEGRA
(*Mycosphaerella fijiensis*)**

MAUREN LISETH GÓMEZ RUIZ

Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:

Ing. Agr. Mauricio Guzmán, M. Sc.

Asesor Externo

Ing. Agr. Carlos Muñoz Ruiz, Ph.D.

Asesor Interno

Ing. Agr. Joaquín Durán Mora, M. Sc.

Jurado

Ing. Agr. Fernando Gómez Sánchez, MAE.

Coordinador Trabajos Finales de
Graduación

Ing. Agr. Luis Alberto Camero Rey, M. Sc.

Director Escuela Agronomía

2013

DEDICATORIA

A mis padres, José Ángel Gómez Artavia y Odalia Ruiz Hernández. A mis hermanos, Antony Ortiz Jarquín, Gabriel Gómez Ruiz y Darío Gómez Ruiz. Porque por ellos busco mejorar día a día, porque mis logros son sus logros.

A toda aquella persona con la capacidad de enseñar, que lo hace con gusto, que son maestros en espíritu y en corazón. Que ligan el conocimiento con la práctica y que creen fielmente que el conocimiento se incrementa cuando se comparte.

A ellos, por su marca en mi vida dedico este triunfo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser luz en mi vida.

A todo el personal del Centro de Investigaciones La Rita, CORBANA, S.A, especialmente en el laboratorio de fitopatología al Sr. Sergio Durán, por toda su colaboración, consejos y enseñanza. Al Ing. Ricardo Villalta por las observaciones hechas al informe final y por su disposición.

Al M.Sc. Mauricio Guzmán Quesada por ser guía en este trabajo, por su visión investigadora incomparable, por ser un maestro.

Al M.Sc. Fabio Blanco, quien me aconsejó y alentó, por su colaboración en el estudio estadístico de esta investigación.

A los profesores Ph.D. Carlos Muñoz y M.Sc. Joaquín Durán, por las observaciones hechas al trabajo escrito.

A Paula Rojas y Jonathan Corrales, por su valiosa colaboración.

A todas las personas que compartieron sonrisas, alegría, consejos, horas de estudio, y momentos de angustia en mi paso por el TEC. Entre ellos, Nathalia Salazar, Tania Alvarado, Aurora Madrigal, Karla Rodríguez, Lissette Valverde, Mariela Quirós, Milagro González, Laura Quesada, Luis Fernando Solano, Warren Cubillo, Luis A. Barrantes, Michael Cordero, Jonathan Masis, Geovanny Cordero, Wagner Andrade, Esteban Blanco, Efraín Tello, Juan Carlos Kopper, Gonzalo Quirós, Andrés Aragonés, Oscar Quesada y muchos más que sin duda hicieron de mi paso por el TEC una experiencia incomparable. Especialmente a la Srta. Lisbeth Sancho Rojas con quien compartí desde el día 1 de mi pasó por TEC una gran amistad.

A la MAE. Andrea González Quirós, por ser mi amiga. Por brindarme su confianza. Por apoyarme y ayudarme en mis proyectos.

Al personal administrativo y docente de la Escuela de Agronomía y el TEC en general, especialmente a la Srta. Yendry Jiménez, sería imposible no mencionarla, porque siempre estaba dispuesta a colaborar conmigo.

En fin, a todas las personas que me han acompañado durante este trayecto, que me brindaron una sonrisa, una crítica constructiva, una visión diferente pero igualmente magnífica de la vida. Muchas gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
LISTA DE CUADROS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ANEXOS.....	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRAC	XIV
1. INTRODUCCION	1
1.1. Objetivo General	4
1.2. Objetivos Específicos	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Generalidades e importancia del cultivo de banano	5
2.2. Sigatoka negra en banano	6
2.2.1. Origen y distribución.....	6
2.2.2. Biología del agente causal de la Sigatoka Negra	6
2.2.3. Ciclo de la enfermedad y morfología de Sigatoka negra.....	7
2.2.4. Proceso Infeccioso.....	11
2.2.5. Sintomatología	12
2.2.6. Manejo de la Sigatoka negra.....	14
2.2.6.1. Control químico.....	14
2.2.6.2. Control Cultural.....	16
2.2.6.3. Control Genético.....	18
2.2.6.4. Control Biológico.....	19
3. MATERIALES Y METODOS	20

3.1. Ubicación.....	20
3.2. Efecto de las condiciones de incubación sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra.....	20
3.2.1. Experimento 1. Efecto de la temperatura, tiempo de incubación y fotoperiodo sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio.....	20
3.2.1.1. Descripción de tratamientos	20
3.2.1.2. Procedimiento experimental	21
3.2.1.3. Descarga de ascosporas	22
3.2.2. Experimento 2. Efecto de la temperatura, tiempo de incubación, fotoperiodo y mojadura en cámara húmeda, sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio.....	24
3.2.2.1. Descripción de tratamientos	24
3.2.2.2. Procedimiento experimental	25
3.2.3. Experimento 3. Efecto de la mojadura foliar inducida sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de campo.....	25
3.2.3.1. Descripción de tratamientos	25
3.2.3.2. Procedimiento experimental	25
3.2.4. Variables de respuesta a estudiar en los experimentos sobre el efecto de incubación sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra	26
3.2.4.1. Esporulación de las lesiones	26
3.2.4.2. Conteo de ascosporas.....	26
3.2.5. Modelo estadístico	26
3.2.6. Análisis estadístico.....	27
3.3. Búsqueda de compuestos con capacidad antiesporulante contra Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>).....	27
3.3.1. Etapa I. Desarrollo de la metodología a utilizar	27
3.3.1.1. Determinación del volumen y la presión (psi) de aplicación	28
3.3.2. Etapa II. Evaluación <i>in vitro</i> de compuestos sobre la esporulación de Sigatoka negra	28
3.3.2.1. Experimento 1. Compuestos inorgánicos	28

3.3.2.2. Experimento 2. Compuestos orgánicos	28
3.3.2.3. Procedimiento experimental	30
3.3.3. Etapa III. Prueba de concentraciones de compuestos que presentaron mayor efecto sobre la esporulación y/o germinación de ascosporas	33
3.3.3.1. Descripción de tratamientos	33
3.3.3.2. Procedimiento experimental	34
3.3.4. Etapa IV. Evaluación en condiciones de campo del efecto antiesporulante de compuestos seleccionados sobre lesiones de Sigatoka negra	
35	
3.3.4.1. Descripción de tratamientos	35
3.3.4.2. Procedimiento experimental	35
3.3.4.3. Recolección de muestras	35
3.3.5. Variables de respuesta a estudiar	36
3.3.6. Modelo estadístico	37
3.3.7. Análisis estadístico	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Efecto de las condiciones de incubación sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra	38
4.1.1. Experimento 1. Efecto de la temperatura, tiempo de incubación y fotoperiodo sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio.....	38
4.1.2. Experimento 2. Efecto del tiempo de incubación, fotoperiodo y mojadura en cámara húmeda, sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio.....	43
4.1.3. Experimento 3. Efecto de la mojadura foliar inducida sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de campo.....	45
4.2. Búsqueda de compuestos con capacidad antiesporulante contra Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>)	46
4.2.1. Etapa I. Desarrollo de la metodología a utilizar	46
4.2.2. Etapa II. Evaluación <i>in vitro</i> de compuestos sobre la esporulación de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	48

4.2.3.	Etapa III. Prueba de concentraciones de compuestos que presentaron efectos sobre la esporulación y/o germinación de ascosporas.....	51
4.2.4.	Etapa IV. Evaluación en condiciones de campo de la capacidad antiesporulante de compuestos orgánicos e inorgánicos sobre Sigatoka negra	52
5.	DISCUSIÓN	55
6.	CONCLUSIONES	62
7.	RECOMENDACIONES.....	64
8.	LITERATURA CITADA	65
9.	ANEXOS.....	79

LISTA DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Diseño de tratamientos para evaluar el efecto de la temperatura (°C), periodo de incubación (h) y fotoperiodo en la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) en condiciones de laboratorio. CORBANA, 2013.	21
2	Diseño de tratamientos para evaluar el efecto de la temperatura, periodo de incubación, fotoperiodo y mojadura en la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) en condiciones de laboratorio. CORBANA, 2013.	24
3	Tratamientos para determinar el efecto de la mojadura foliar inducida sobre la esporulación Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) en condiciones de laboratorio. CORBANA, 2013.	25
4	Compuestos inorgánicos (fertilizantes) estudiados para evaluar su efecto sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) en banano. Experimento 1, CORBANA, 2013.	29
5	Compuestos orgánicos estudiados para evaluar su efecto sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) en banano. Experimento 2. CORBANA, 2013.	30
6	Tratamientos utilizados en prueba de concentraciones, para evaluar la capacidad antiesporulante de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre lesiones de	34

	Sigatoka negra. CORBANA 2013.	
7	Compuestos inorgánicos y orgánicos seleccionados para evaluar en campo su efecto sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra. CORBANA 2013.	36
8	Porcentaje de esporulación de lesiones de Sigatoka negra y número de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> descargadas, según tiempo de incubación (h), temperatura (°C) y fotoperiodo en condiciones de laboratorio. Prueba 1. Fecha de muestreo: 25 enero. CORBANA, 2013.	39
9	Efecto del tiempo de incubación (h), fotoperiodo y temperatura (°C), sobre el porcentaje de esporulación y el promedio de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> descargadas. Prueba 1. Fecha de muestreo: 25 enero. CORBANA, 2013.	40
10	Porcentaje de esporulación de lesiones de Sigatoka negra y promedio de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> descargadas según tiempo de incubación (h), temperatura (°C) y fotoperiodo en laboratorio. Prueba 2. Fecha de muestreo: 18 abril, 2013. CORBANA, 2013.	41
11	Efecto del tiempo de incubación (h), fotoperiodo y temperatura (°C), sobre el porcentaje de esporulación de lesiones de Sigatoka negra y el promedio de ascosporas descargadas. Prueba 2. Fecha de muestreo: 18 abril, 2013. CORBANA, 2013.	42
12	Porcentaje de esporulación de lesiones de Sigatoka negra y número de ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	43

descargadas bajo condiciones fotoperiodo, incubación y mojadura. Fecha de muestreo: 13 marzo y 9 abril, 2013. CORBANA, 2013.

- | | | |
|-----------|---|-----------|
| 13 | Efecto del tiempo de incubación (h), fotoperiodo y mojadura, sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra y promedio de ascosporas descargadas. Fecha de muestreo: 13 marzo y 9 abril, 2013. CORBANA, 2013. | 44 |
| 14 | Porcentaje de esporulación y número de ascosporas descargadas por lesiones de Sigatoka negra desarrolladas en hojas de banano sometidas a diferentes niveles de mojadura foliar. CORBANA, 2013. | 45 |
| 15 | Efecto de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra y la germinación de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> en condiciones de laboratorio. Experimento 1 y 2. CORBANA, 2013. | 50 |
| 16 | Efecto de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra y la germinación de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> en condiciones de laboratorio. CORBANA, 2013. | 51 |
| 17 | Efecto de la urea, ácido acético, ácido cítrico y cianamida cálcica sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra y la germinación de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> en condiciones de campo. CORBANA, 2013. | 53 |

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Estructuras de diseminación de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> . (A) Conidio, nótese la cicatriz de la unión con el conidióforo. (B) Ascosporas, nótese la unión de las células. Visto a 40 X *8. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí. 2013.	9
2	Ciclo reproductivo de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> . (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí. 2013.	10
3	Etapas de infección de Sigatoka negra en banano. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí. 2013.	15
4	Esquema de la metodología para la descarga de ascosporas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> realizada en el laboratorio de Fitopatología. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí. 2013.	23
5	Recolección de muestras y selección de lesiones. (A) Lote testigo Centro de Investigaciones Agrícolas La Rita, CORBANA. (B) Muestras de hojas de banano afectadas por Sigatoka negra con lesiones con capacidad esporulante, (C) Sacabocados de 2 cm de diámetro utilizado en selección de lesiones esporulantes, (D) Discos de hojas de banano con lesiones esporulantes seleccionadas para las pruebas. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí. 2013.	31
6	Discos de Sigatoka negra adheridos a papel bond, sobre los cuales se aplicaron los tratamientos. (Gómez 2013).	32

CORBANA, La Rita, Pococí. 2013..

- 7** Equipo utilizado en la aplicación de los tratamientos. (A) **33**
Aerógrafo Titan®, modelo BD-132A, (B) Minitorre de
aspersión, basada en el modelo de Calpouzos (1962).
(Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí. 2013.
- 8** Severidad promedio de la Sigatoka negra en hojas de **46**
banano, sometidas a diferentes regímenes de mojadura
foliar artificial en campo. El testigo corresponde a las
condiciones naturales de mojadura en el periodo
experimental y a los tratamientos se les indujo mojadura
artificial mediante la aspersión de agua con una bomba
manual. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí.
2013.
- 9** Cobertura de aplicación con diferentes volúmenes a 20 **47**
psi. (A) volumen 1 ml (1.250 L/ ha), (B) volumen 0,75 ml
(937 L/ ha), (C) volumen 0,5 ml (625 L/ ha), (D) volumen
0,2 ml (312 L/ ha). (Gómez 2013). CORBANA, La Rita,
Pococí. 2013.
- 10** Cobertura de la aplicación con diferentes presiones, **48**
utilizando 0,5 ml. (A) 20 psi, (B) 30 psi, (C) 40 psi. (Gómez
2013). CORBANA, La Rita, Pococí. 2013.
- 11** Descarga y germinación de ascosporas de *M. fijiensis* de **54**
lesiones de Sigatoka negra aplicadas con diferentes
compuestos orgánicos e inorgánicos. (Gómez 2013).
CORBANA, La Rita, Pococí. 2013.

LISTA DE ANEXOS

Número	Título	Página
1	Promedio de precipitación semanal, registrado en la estación meteorológica La Rita, Corbana. Periodo octubre 2012-agosto 2013.	79
2	Cronograma de actividades que se desarrollaron durante el periodo de investigación (setiembre 2012-noviembre 2013).	80
3	Escala de Stover modificada por Gauhl (1989). para evaluación de Sigatoka negra. Fuente: Marín y Romero <i>s.f.</i>	81
4	Estados de candela según Escala de Brun (1963). Fuente: Marín y Romero <i>s.f.</i>	82

RESUMEN

Se evaluó el efecto de las condiciones de incubación y de compuestos orgánicos e inorgánicos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra. Se estudió en condiciones de laboratorio el efecto del tiempo de incubación (h), la temperatura, el fotoperiodo y la adición de mojadura previamente a la incubación sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra. Además, se evaluó el efecto de once compuestos orgánicos y diez inorgánicos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra. Los compuestos que mostraron mejores efectos en condiciones de laboratorio se seleccionaron para su evaluación en campo. No se observó efecto de los factores tiempo de incubación, fotoperiodo y temperatura sobre la esporulación de las lesiones en condiciones de laboratorio. Solamente la mojadura de las lesiones antes de la incubación aumentó el porcentaje de esporulación y el número de ascosporas descargadas. Los compuestos evaluados no afectaron significativamente la esporulación de las lesiones en condiciones de laboratorio. No obstante, por algunos de los efectos observados se seleccionaron tres compuestos para la prueba de campo: cianamida cálcica, ácido acético y ácido cítrico, los cuales se asperjaron a una concentración del 10 % sobre las hojas afectadas por la enfermedad en campo. Solo el ácido acético redujo significativamente la esporulación de las lesiones y la cantidad de ascosporas descargadas. Este efecto se mantuvo inclusive a los nueve días después de la aplicación. Se concluye que, en condiciones de laboratorio, el tiempo de incubación, la temperatura (entre 24-27,5 °C) y el fotoperiodo no tienen efecto práctico sobre el porcentaje de esporulación de lesiones de Sigatoka negra, ni sobre la descarga de ascosporas. Solamente aumentan la esporulación y la descarga de ascosporas cuando se aplica una mojadura sobre las lesiones, previa incubación. El ácido acético al 10 % mostró ser un fuerte inhibidor de la esporulación y este constituye el primer informe del efecto de este ácido graso como antiesporulante contra la Sigatoka negra.

Palabras clave: antiesporulantes, ascosporas, periodo de incubación, producción de inóculo.

ABSTRACT

The effect of the incubation conditions and organic and inorganic compounds on the sporulation black Sigatoka lesions was evaluated. The effect of incubation time, temperature, photoperiod and the addition of wetting prior to incubation on sporulation of black Sigatoka disease was examined under laboratory conditions. Furthermore, the effect of eleven organic and ten inorganic compounds on sporulation of black Sigatoka lesions was evaluated. Compounds that showed better effects in laboratory conditions were selected for field evaluation. No effect of the incubation time, photoperiod and temperature on the sporulation of lesions was observed. Only the addition of wetting to the lesions prior to incubation increased the percentage of sporulation and the number of ascospores discharged. The evaluated compounds did not significantly affect the sporulation of lesions in laboratory conditions. However, for some of the effects observed three compounds were chosen for field evaluation: calcium cyanamide, acetic acid and citric acid, which were sprayed at a concentration of 10% on the surface of diseased leaves. Acetic acid alone significantly reduced sporulation of lesions and the amount of ascospores discharged from the lesions. This effect remains in the time including after nine days of the application. We conclude that, in laboratory conditions, the incubation time, the temperature (24 to 27.5 °C) and photoperiod have no practical effect on the percentage of sporulation of black Sigatoka lesions and ascospores discharge; only increase these variables when a wetting of the lesions was performed previous to incubation. Acetic acid at 10 % was found to be a strong inhibitor of sporulation and this is the first report of the effect of this fatty acid as an antsporulant against black Sigatoka.

Keywords: antsporulant, ascospores, incubation period, inoculum production.

1. INTRODUCCION

La Sigatoka negra, enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet: (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*), (Leach 1964, Crous *et al.* 2002), es la responsable del principal problema fitosanitario que afecta a las plantaciones de banano en América, África y Asia (Carlier *et al.* 2000, Lepoivre *et al.* 2003, Marín *et al.* 2003, Guzmán *et al.* 2013). *M. fijiensis* presenta características biológicas que le confieren una elevada capacidad de producción de ascosporas, alto porcentaje de esporulación en condiciones de humedad adecuada, mayor número de ciclos sexuales por año, capacidad de diseminación por aire y una elevada tasa de colonización de tejido (Romero 2003) lo que caracteriza a la enfermedad como la más agresiva en el cultivo de banano.

M. fijiensis se reproduce tanto asexual como sexualmente. Las estructuras reproductivas en la fase asexual son los conidios los cuales se producen con mayor abundancia en las lesiones jóvenes en la parte inferior de la hoja, aunque también pueden encontrarse en el haz. Stover (1980) estimó que se producen cerca de 1.200 conidios en aproximadamente 20 mm² de hoja (envés) de banano con lesiones en etapa de raya de un cultivar Cavendish. En la reproducción sexual se producen las ascosporas que constituyen la principal fuente de inóculo y la principal forma de diseminación de la enfermedad (Carlier *et al.* 2000). Las ascosporas se encuentran en lesiones viejas (en estado de mancha) dentro de cuerpos fructíferos denominados pseudotecios (Crous y Mourichon 2002). Algunos datos indican que una lesión de Sigatoka negra en estado de mancha gris puede producir hasta 480 pseudotecios, estos poseen de 2 a 4 ascas cada uno y cada asca tiene la capacidad de producir 8 ascosporas por lo que en total cada pseudotecio produce entre 16 y 32 ascosporas. En términos generales se indica que una lesión de Sigatoka negra puede liberar de 7.680 a 15.360 ascosporas (Orozco-santos *et al.* 2013).

La Sigatoka negra se caracteriza por una destrucción acelerada del área foliar de la planta, debido a una fuerte necrosis, que afecta el proceso fotosintético

(Hidalgo *et al.* 2005) Guzmán 2013 expone que *M. fijiensis* no causa la muerte de la planta, pero el efecto de esta enfermedad en el crecimiento y la producción son claramente devastadores, lo que ocasiona que la planta llegue a la etapa de floración con un reducido número de hojas funcionales, acción que perjudica el correcto llenado de racimos y por ende una disminución del peso de estos y del largo de los dedos, así como la vida verde del fruto (Meredith y Lawrence 1970, Stover 1972, Ramsey *et al* 1990 Marín y Romero 1998, Guzmán 2006). Guzmán (2006) indica que en plantaciones comerciales de banano Cavendish, la principal pérdida se relaciona con las plantas de menor cantidad de hojas a la cosecha (menos de 4) debido al riesgo que se presente maduración prematura de la fruta, estos racimos usualmente son eliminados directamente en el campo.

En términos epidemiológicos, la Sigatoka negra es descrita como una enfermedad policíclica, que presenta una alta incidencia y severidad en las plantaciones de banano, cuando las condiciones climáticas de humedad y temperatura son aptas para su desarrollo (Stover 1983). En las plantaciones bananeras, el manejo de la enfermedad se realiza mediante la integración de prácticas que conlleven a una disminución en el nivel de inóculo y a establecer un ambiente menos favorable para el desarrollo de la enfermedad. Este manejo se basa en la combinación de prácticas culturales, medidas fitosanitarias y en la aplicación de fungicidas químicos (Guzmán 2002).

El principal rubro en los costos de producción en una plantación de banano, lo genera el combate químico de Sigatoka negra, con un impacto económico significativo (Guzman 2003). Actualmente, se invierte cerca de US \$ 2. 000 /ha/año para el combate de la Sigatoka negra.¹ Otro aspecto que dificulta su control es la resistencia que ha generado el patógeno a fungicidas sistémicos como triazoles, benzimidazoles y estrobilurinas (QoI's) (Romero y Sutton 1997, Guzman *et al.* 2000, Marín *et al.* 2003, Orozco-Santos *et al.* 2010). El desarrollo de estrategias que permitan disminuir la dependencia a los productos químicos en el combate de esta enfermedad es un reto permanente que conlleva a la investigación constante

¹ Murillo, G. 2013. Costo del control químico de la Sigatoka negra. CORBANA S.A. Comunicación Personal. Correo electrónico: gmurillo@corbana.co.cr

(Jiménez *et al.* 2009). Hasta el momento, no se ha identificado alguna sustancia, compuesto capaz de suprimir por completo o en buena medida la esporulación de *Mycosphaerella fijiensis*, por lo que se hace necesaria la búsqueda de una alternativa efectiva, ya que esto podría contribuir sustancialmente al manejo de la enfermedad y a mejorar la sanidad del cultivo de banano²

La hojarasca depositada en el suelo de la plantación representa una importante fuente de inóculo (Orozco-Santos y Orozco 2004). Se han realizado estudios con el fin de disminuir este importante reservorio, entre ellas las aplicaciones de soluciones de urea (Guzmán y Romero 1995, Villalta y Guzmán 2005) a nivel de laboratorio y campo, las cuales han mostrado resultados prometedores, sin embargo deben ser estudiados a mayor profundidad

El propósito de la investigación fue estudiar las condiciones de incubación que inciden en la esporulación de *Mycosphaerella fijiensis*, así como identificar algún (os) compuesto (s) capaz de reducir marcadamente la esporulación de dicho patógeno y que pueda ser utilizado para reducir inóculo y así contribuir al manejo integrado de las enfermedad en las plantaciones.

² Guzmán. M. 2013. Combate de la Sigatoka negra. Comunicación Personal. CORBANA S.A. Correo electrónico: mguzman@corbana.co.cr

1.1. Objetivo General

- Estudiar el efecto de las condiciones de incubación y diferentes compuestos (inorgánicos y orgánicos) sobre la esporulación de *Mycosphaerella fijiensis*.

1.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la incubación en cámara húmeda, fotoperiodo, tiempo de incubación, temperatura, adición de mojadura previa incubación y mojadura inducida en campo sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra.
- Determinar el efecto *in vitro* de diferentes compuestos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra y la germinación de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.
- Realizar una evaluación preliminar en campo con aquellos compuestos que demuestren mayor capacidad de inhibir *in vitro* la esporulación de lesiones de Sigatoka negra.

Hipótesis

Técnica: la aplicación de compuestos orgánicos e inorgánicos sobre tejido foliar de banano con lesiones maduras de Sigatoka negra afecta la esporulación de *Mycosphaerella fijiensis*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades e importancia del cultivo de banano

El banano es una planta herbácea, monocotiledónea, perteneciente al género *Musa* (Familia: Musaceae, orden: Zingiberales) (Champion 1986, Stover y Simonds 1987, Soto 1992, Heslop-Harrison y Schwaracher 2007). La planta de banano es originaria del extremo oriente (India hasta Filipinas), se desarrolla de forma adecuada en las regiones tropicales que presentan condiciones húmedas y cálidas (Soto 1992).

El banano es un cultivo perenne que crece rápidamente y que puede cosecharse durante todo el año. Este cultivo se posiciona como una de las principales fuentes de ingreso en la economía de más de 120 países del trópico y subtropical en donde es cultivado; como por ejemplo: Ecuador, Filipinas, Honduras y Costa Rica, entre otros (Arias *et al.* 2004). Durante los años 90, se estima que la producción de banano aumentó en un 30 por ciento, debido al aumento en la producción de Cavendish, América Latina es la principal región productora de Cavendish, seguido de Asia (Arias *et al.* 2004).

En Costa Rica el cultivo de banano tiene una importancia tanto económica como social. Según CORBANA (2010), la industria bananera es la principal fuente de empleo directo e indirecto en Costa Rica, particularmente en la zona caribeña del país; cifras indican que de cada 100 trabajadores de la región Caribe, aproximadamente el 76 % están ligados directa o indirectamente con la producción de banano

Por otro lado, la producción de banano en Costa Rica tiene un significativo aporte en las exportaciones. Para el año 2011 las exportaciones de banano aumentaron en un 5,21 % en relación con el año 2010 y llegaron a las 106. 496. 113 cajas. Con ello, las divisas aumentaron en 8,11 % en relación al año previo para obtener un total de US \$ 804. 986. 150 (Sánchez *et al.* 2012).

Se registró para el año 2011 un total de 42.017 hectáreas dedicadas a la producción de banano en Costa Rica, de este total el 57,7 % pertenece a fincas de multinacionales cuyo capital social en su mayoría es propiedad de comercializadoras internacionales; y el 42,3 % a productores independientes cuyo capital social pertenece mayoritariamente a costarricenses o extranjeros con más de 5 años de residir en el país (Sánchez *et al.* 2012).

2.2. Sigatoka negra en banano

2.2.1. Origen y distribución

La enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (*Pseudocercospora fijiensis* Deighton) fue reportado por primera vez en febrero de 1963 en el distrito de Sigatoka de la isla de Viti Levu en Fiji, de ahí el origen del nombre de la enfermedad (Rodhes 1964, Carlier *et al.* 2000). La Sigatoka negra fue confirmada por primera vez en América en 1972 específicamente en Honduras (Stover y Dickson 1976). Posterior a esto, se diseminó rápidamente por toda Centroamérica. Para el año 1979 la enfermedad se encontraba en la zona norte y Caribe de Costa Rica afectando plantaciones de plátano (Ortiz *et al.* 2007).

Entre el año 1973 y 1980 sucedieron grandes epidemias de la enfermedad, esta se diseminó rápidamente a países de América y el Caribe, El Salvador (1990), Cuba (1990), Venezuela (1991), Perú (1994), Jamaica (1995), Bolivia (1996), República Dominicana (1996), Brasil (1998), USA (1999) y Haití (1999) (Carlier *et al.* 2000). El último reporte de la enfermedad se dio en julio de 2012 en la Isla de Guadalupe (Anselm 2012).

2.2.2. Biología del agente causal de la Sigatoka negra

El agente causal de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) se ubica taxonómicamente de la siguiente forma:

Filo: Ascomycota, caracterizado por la presencia de una fase sexual (Teleomorfo) y otra asexual (Anamorfo) para completar su ciclo. Produce esporas sexuales, llamadas ascosporas, dentro de ascas y también esporas asexuales (conidios) en hifas libres, conidióforos (Webster y Weber 2007).

El género *Mycosphaerella* pertenece a la clase Dothideomycetes (anterior Loculoascomycetes): lo cual indica que son ascomicetes con ascostroma. Produce ascas dentro de lóculos (cavidades) preformado en un estroma. El ascostroma puede ser monolocular (pseudotecio) o multilocular (Webster y Weber 2007). Su estado imperfecto *Pseudocercospora fijiensis* pertenece a la clase Hyphomycetae (Manzo *et al.* 2005).

Pertenecen al orden Capnodiales (Churchill 2010), en el cual se agrupa un gran número de ascomicetos con variedad de formas conidiales, el asca puede ser ovoide a cilíndrica, en fascículos, ausencia de hifas interascales dentro en el lóculo (Webster y Weber 2007).

2.2.3. Ciclo de la enfermedad y morfología de Sigatoka negra

Según Zadocks y Shein (1979), debido a su capacidad de reproducción de forma repetida se considera la Sigatoka negra una enfermedad policíclica, se pueden encontrar lesiones jóvenes y avanzadas de la enfermedad, incluso en la misma hoja. Las etapas de colonización, esporulación y dispersión son constantes durante el desarrollo de la enfermedad, además presenta infección ramificada porque ocurre tanto con esporas sexuales como asexuales y éstas no necesariamente se presentan de forma alternada. *Mycosphaerella fijiensis* Morelet es un hongo heterotálico (Mourichon y Zapater 1990), lo que indica que el talo es sexualmente autoestéril, solo se da fecundación entre diferentes talos. La reproducción sexual contribuye grandemente a la variabilidad y a la evolución del patógeno (Conde *et al* 2010). El hongo *Mycosphaerella fijiensis* posee tres cuerpos de fructificación: conidióforo que sostiene las conidias, espermagonio (masculino) que contiene las espermacias y el pseudotecio (femenino) que contiene las ascosporas. Tanto espermagonio y pseudotecio son formados en una cámara que se encuentra debajo del estoma de la hoja (Meredith y Lawrence 1969) (Figura 2).

El agua libre sobre la superficie de la hoja juega un papel primordial para el desarrollo de la enfermedad (Guzmán 2003, Marín *et al.* 2003). Es fundamental tanto para la fertilización de las tricóginas (estructura que contiene el gameto femenino en hongos ascomicetes), como para la expulsión de las ascosporas. Los espermagonios son la parte masculina (con forma de pera), estos son más

abundantes en la parte inferior de la hoja (envés) en ellos se producen las espermacias, que son los gametos masculinos; éstas son incoloras, en forma de bastoncillos o varillas transparentes (Stover 1980). Cuando las espermacias se encuentran maduras son expulsadas del espermagonio, siendo llevadas por el rocío o las gotas de lluvia fertilizando las hifas vecinas (tricóginas). Una vez dada la fertilización los pseudotecios se forman en lesiones maduras, en las etapas 5 y 6 de la escala de Fouré (1985) (Meredith y Lawrence 1969, Bennett y Arneson 2003). El pseudotecio, contiene las ascas, éstas a su vez contiene las ascosporas. Una vez maduras las ascosporas, es necesaria la hidratación del pseudotecio para la liberación de las mismas (Stover 1976, Fouré y Moreau 1992, Guzmán 2003), la parte superior que emerge de la hoja tiene una cavidad por donde son expulsadas cuando existe humedad.

La liberación de las ascosporas se presenta debido al aumento de turgencia del asca por la absorción de agua. El epiplasma recubre la pared del asca joven, existe una vacuola grande posicionada centralmente que contiene savia en donde las ascosporas inmaduras se suspenden. El epiplasma es rico en polisacáridos el cual se visualiza citoquímicamente como una mancha de color rojo por la tinción con yodo molecular y yoduro potásico (Iugol), a medida que el asca madura, el color rojo disminuye su intensidad debido a la conversión de polisacáridos a osmólitos de menor peso molecular. Debido a esto se da un aumento de la concentración osmótica de la savia del asca, seguido de una mayor captación de agua. Como resultado, se da una presión de turgencia que ocasiona que el asca se estire y provoca que la misma expulse las ascosporas (Webster y Weber 2007). Cada pseudotecio tiene entre 2 y 4 ascas, por lo que un pseudotecio puede producir de 16 a 32 ascosporas (Stover 1980).

Las células sexuales llamadas ascosporas son la estructura más importante respecto a la diseminación de la enfermedad, debido a la gran producción de estructuras llamadas pseudotecios en donde se producen (Marín y Romero 1998, Agrios 2005). Las ascosporas son incoloras (hialinas) de forma fusiforme clavada, están formadas por dos células ligeramente constrictas en el septo (Figura 1.B)

Miden de 11,5 a 15,6 μm de longitud y 2,5 a 5,0 μm de ancho (Meredith y Lawrence 1969, Mulder y Holliday 1974, Mulder y Stover 1976).

La fase asexual (*Pseudocercospora fijiensis*) se presenta cuando se desarrollan las primeras lesiones de la enfermedad en el tejido (pizca y estría). Los conidios se forman sobre conidióforos que emergen directamente por el estoma (Mulder y Stover 1976). Los conidios son de color pálido a un leve olivo, lisos, largos y presentan tres o más septas (Benneth y Arneson 2003). Los conidios miden de 30 a 132 μm de longitud y 2,5 a 5 μm en la parte más ancha (Meredith y Lawrence 1969, Mulder y Stover 1976) (Figura 1.A). Éstos juegan un papel predominante en el mecanismo de defensa del patógeno cuando las condiciones ambientales no son las ideales (Gauhl 1994).

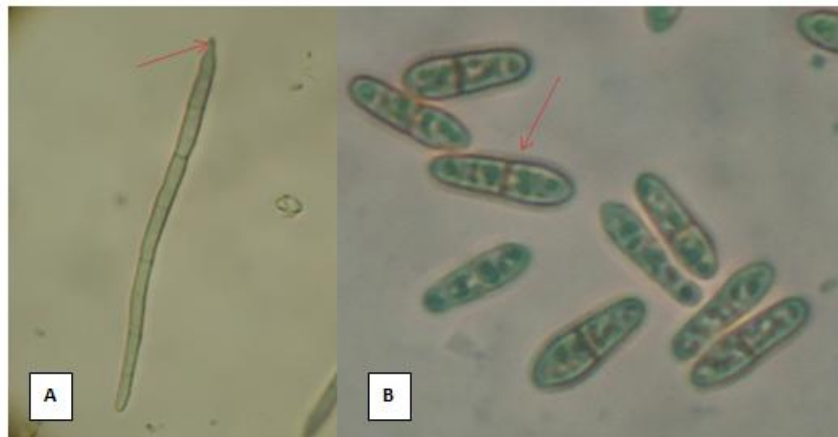


Figura 1. Estructuras de reproducción de *Mycosphaerella fijiensis*. **(A)** Conidio, nótese la cicatriz de la unión con el conidióforo. **(B)** Ascosporas, nótese la ligera constricción en la unión de las células. 40 X *8. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí, 2013.

Ambas, conidios y ascosporas son las estructuras de diseminación del patógeno (Marín y Romero 1998); sin embargo, el número de conidios transportados por el viento llega a ser diez veces menor que el número de ascosporas, dado a que son estructuras pesadas que no pueden ser transportadas fácilmente por este agente de diseminación (Meredith y Lawrence 1969). Por tanto, se considera a los conidios como medio de difusión local de la enfermedad, siendo transportados principalmente a través del salpique de la lluvia, mientras que las ascosporas

pueden llegar a infectar plantas que se ubiquen a larga distancia de la fuente del inóculo (Agris 2005).

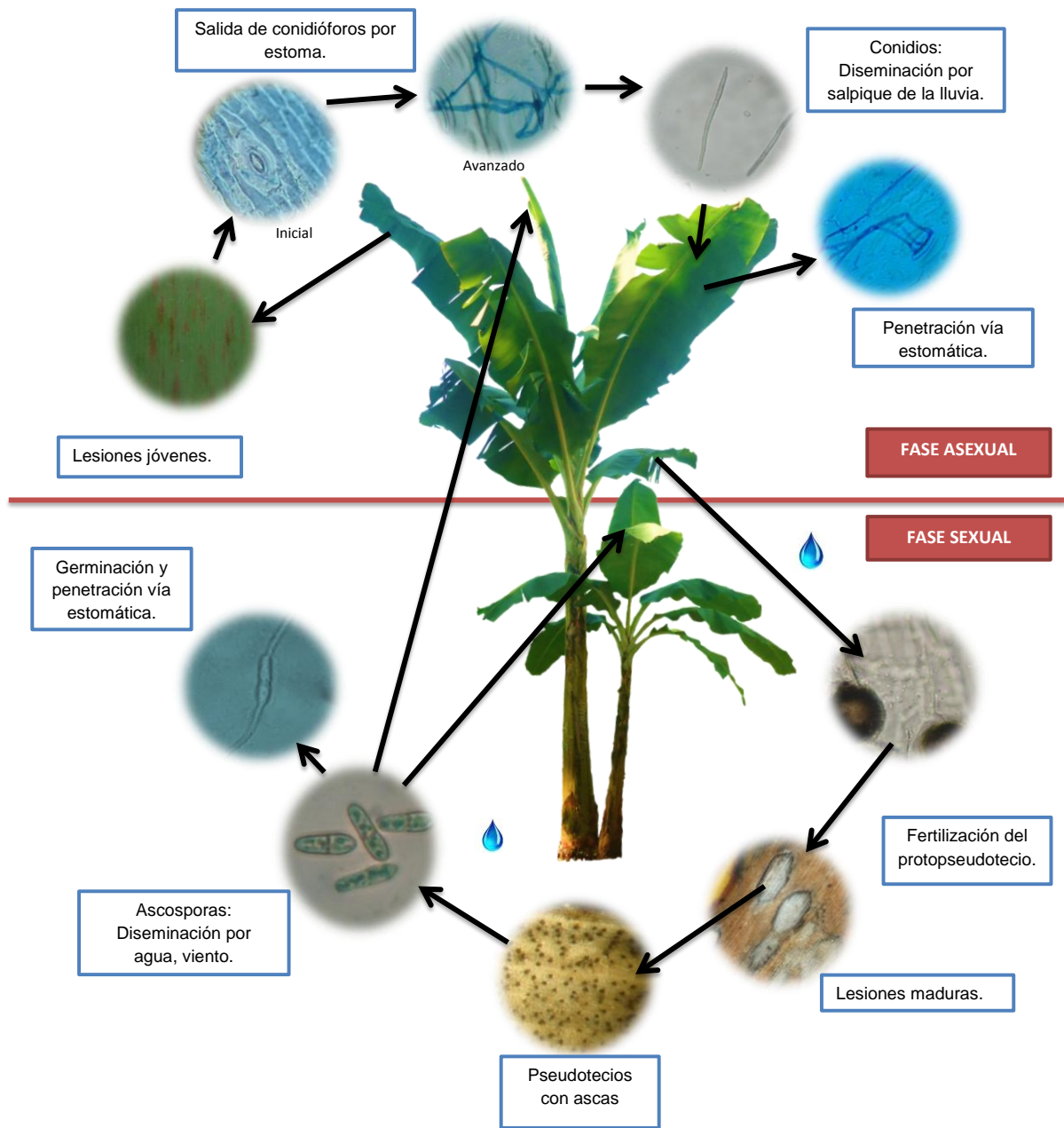


Figura 2. Ciclo reproductivo de *Mycosphaerella fijiensis*. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí, 2013.

Las ascosporas se encuentran en el aire en cantidades variables (Gauhl 1989). Estas estructuras de diseminación pueden verse afectadas en su capacidad infectiva por las condiciones ambientales, siendo las más importantes la radiación ultravioleta en la luz solar y temperatura. Ambos factores desnaturalizan la proteína que forma parte de la pared en las esporas (Parnell *et al.* 1998). Las longitudes de onda que oscilan entre 250-270 nm, que no logran llegar hasta el suelo son las más letales (Setlow 1974; Rotem *et al.* 1985, Chuang y Su 1988; Rotem y Aust 1999).

Stover (1980) indicó que las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* tienen capacidad de dispersión de hasta 50 km, dependiendo de la presencia o no de barreras geográficas importantes. En un estudio realizado por Calvo y Romero (1998), se establecieron parcelas a una distancia lineal a 2.000, 3.000 y 4.000 m de la fuente de inóculo más cercana. Los autores concluyeron que la eficiencia de dispersión del organismo es muy buena hasta la distancia máxima evaluada (4.000 m).

2.2.4. Proceso Infeccioso

Luego de que la espora o conidio encuentra un hospedero y las condiciones de ambiente adecuadas, germina y penetra a la planta por los estomas (Figura 2). Debe existir una lámina de agua sobre el tejido para que se dé la germinación de la estructura, en caso de que las condiciones ambientales no sean las adecuadas entran en un periodo de latencia hasta que las mismas sean favorables. (Marín y Romero 1998). La temperatura debe oscilar entre 26,5 a 28 °C con una humedad relativa mayor del 92-100 % para conidios y 98-100 % en el caso de las ascosporas, en estas condiciones la germinación del conidio o espora sucede en un lapso de 2 a 3 horas, tardando aproximadamente de 48 a 72 horas para que suceda la penetración del patógeno al tejido (Guzmán 2003).

El patógeno entra al tejido exclusivamente por la vía estomática, al desarrollar tubos germinativos que inicialmente germinan a lo largo de las células guarda de los estomas y se desarrollan en el tejido vía apoplasto (Lorenzo *et al.* 1978, Flores *et al.* 1985, Kema *et al.* 1996, Lepoivre *et al.* 2002, Guzmán 2003). Una vez dada la

penetración del patógeno, este permanece en la cavidad subestomática durante 2 a 4 semanas de manera asintomática. Algunos autores coinciden en que el sitio de infección primaria de *Mycosphaerella fijiensis* se da en el envés de la hoja de banano, debido a que la densidad de estomas es mayor en la parte abaxial y el ápice de la misma (Meredith y Lawrence 1970, Sandoval y Muller, 1999, Cayón *et al.* 1991, Hidalgo *et al.* 2006, Rodríguez y Cayón 2006).

En estudios realizados por Lepoivre *et al.* (2002) se demuestra que *Mycosphaerella fijiensis* es un parásito biotrófico en los primeros estados de desarrollo, debido a que coloniza inicialmente los espacios intercelulares sin la formación de haustorios, donde el tejido del hospedante permanece vivo y el organismo se alimenta de sus propias reservas o del material disponible del hospedante en los espacios extracelulares, sin matarlo. Se da una relación biotrófica después de la penetración de 3 a 4 semanas antes de aparición de los primeros síntomas. Posteriormente, se da un crecimiento de las hifas dentro de las células del tejido, saturando los espacios extracelulares, iniciando la fase necrotrófica, en la cual el hongo produce la muerte celular del hospedante. Es entonces que los síntomas comienzan a ser evidentes, la hoja de banano comienza a cubrirse de lesiones, primero pequeños puntos que van aumentando de tamaño hasta formar lesiones grandes (Lepoivre *et al.* 2002, Kema *et al.* 1996).

2.2.5. Sintomatología

En el envés de la hoja y en el margen izquierdo distal se dan los primeros indicios de la presencia de la enfermedad. Estos síntomas se dan en fases de desarrollo a través del tiempo (Fouré 1985). Inicialmente se presentan como pequeñas manchas amarillas o rayas de forma paralela a la vena de la hoja. Posteriormente, las manchas crecen de 1 a 2 centímetros de largo y se tornan de color marrón con el centro de color gris. El tejido alrededor de la lesión se vuelve amarillo y muere; estas manchas se unen hasta formar grandes áreas muertas en la hoja (Agrios 2005).

En un estudio realizado por Rodríguez y Cayón (2008), se demostró que a partir de los primeros estadios de la enfermedad se observan daños irreparables en

los tejidos, sin embargo, los mayores efectos se observan en el estadio 4 (Figura 3). Estos daños inciden directamente sobre el desarrollo y producción de la planta.

Las hojas enteras mueren en pocas semanas, dejando solo unas pocas hojas en funcionamiento, lo que da como resultado que los racimos de fruta no llenen adecuadamente, se maduren y caigan. Cuando el fruto está a punto de madurez y se presenta una infección fuerte se produce una maduración desigual del fruto (Agrios 2005). Los síntomas de la enfermedad se han clasificado en 6 etapas (Meredith y Lawrence 1969, Fouré 1985) (Figura 3):

- a. Etapa inicial de pizca: los síntomas iniciales no son fácilmente visibles, estos se observan como pequeñas pizcas aproximadamente de 0,25 mm de diámetro, sobre el envés de la hoja con una coloración café rojizo. Las pizcas son más abundantes hacia el borde la punta de la hoja. Los síntomas iniciales se presentan de 14 a 20 días después de la infección.
- b. Primera etapa de raya: en esta etapa las pizcas se comienzan a alargar y a hacerse un poco más anchas, hasta formar una raya color café rojizo de aproximadamente 20 mm de longitud y 2 mm de ancho, estas son paralelas a las venas laterales de las hojas. Se encuentran distribuidas de forma variable a lo largo de la hoja, pueden encontrarse en el borde, a ambos lados de la hoja, también se pueden encontrar agregados en una banda a uno o ambos lados de la nervadura.
- c. Segunda etapa de raya: la raya continua alargándose, teniendo un cambio de color de café rojizo a café oscuro pudiendo llegar a una coloración negra. En esta etapa la raya se observa en el haz de la hoja.
- d. Primera etapa de mancha: las estrías se ensanchan tornándose de color marrón oscuro, se desarrolla un borde acuoso alrededor de la mancha.
- e. Segunda etapa de mancha: la zona central negra de la mancha comienza a colapsar y se hace más evidente el borde acuoso alrededor de la mancha, también se da una coloración amarilla en el tejido de la hoja que se encuentra después del borde acuoso.
- f. Tercera etapa mancha madura: en esta etapa el centro de la mancha se seca tornándose de color gris pálido. Se puede observar una zona de transición entre el tejido verde y el área afectada de color amarillo brillante.

2.2.6. Manejo de la Sigatoka negra

2.2.6.1. Control químico

Debido a la agresividad de la Sigatoka negra en los sistemas de producción bananera, se hace indispensable el uso de fungicidas de una forma intensiva con el fin de producir cantidades de banano aceptables y de alta calidad (Patiño 2006). De acuerdo a la forma de acción, los fungicidas utilizados en el control de la Sigatoka negra pueden ser agrupados en tres categorías: fungicidas de contacto o protectante, fungicidas de acción sistémica local y fungicidas sistémicos.

Por su parte los fungicidas protectantes son depositados en la superficie de la hoja antes de que se dé la infección, inhabilitando la germinación y penetración de la espora o conidio dentro de los estomas de la hoja (Orozco-Santos *et al.* 2013).

Los fungicidas sistémicos penetran la cutícula de la hoja e inhiben el patógeno cuando se encuentra dentro de ella, teniendo efecto curativo. Los fungicidas sistémicos tienen como característica principal la capacidad de penetración en los tejidos de la planta. Su forma de acción radica en la inhibición específica de uno o más sitios en el metabolismo del hongo. Sin embargo, esta característica ha generado un punto débil en este grupo de fungicidas ya que el hongo, a través de modificaciones genéticas logra desarrollar “razas tolerantes” al fungicida (Orozco-Santos *et al.* 2013).

En América Latina, el Benomyl (benzimidazol) ha sido el fungicida sistémico más utilizado para el control de la Sigatoka negra. Además el Tridemorf y una larga lista de triazoles comparten este modo de acción, lo que los hace altamente susceptibles a generar resistencia en el patógeno. Según Martínez y Guzmán (2010), *Mycosphaerella fijiensis* ha desarrollado resistencia a los grupos de los benzimidazoles, triazoles y estrobirulinas, lo cual genera una disminución de su eficacia en el campo y limitaciones en su uso.

Actualmente se realizan aplicaciones alternantes de protectantes (Mancozeb o Clorotalonil) con sistémicos (benzimidazoles, triazoles, morfilina, estrobilurina) junto con aceite o en una emulsión agua-aceite. En el 2007 en Costa Rica se ejecutó una estrategia de control químico basada en la mezcla de triazoles, tridemorf y



Figura 3. Etapas de infección de Sigatoka negra en banano. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí, 2013.

aplicaciones de mancozeb a dosis altas de hasta 1500 g i.a/ha por aplicación y en intervalos cortos (Murillo y Guzmán 2007). Se utiliza como complemento en los fungicidas sistémicos aceite agrícola, debido a que posee efecto fungistático y a que ayuda a que se dé la penetración del producto al tejido (Orozco-Santos *et al.* 2013).

2.2.6.2. Control Cultural

El control cultural se refiere a la ejecución o reforma de prácticas que disminuyan el ambiente favorable para el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*, mediante la afectación de la reproducción, diseminación e infección de tejido sano por parte del patógeno (Agris 2005). Los objetivos que se desean alcanzar mediante la implementación del control cultural son la reducción de la fuente de inóculo, modificación del microclima que favorecen el desarrollo del patógeno e incrementar el vigor de las plantas para que sean menos susceptibles al ataque de la Sigatoka negra (Marín *et al.* 2003, Orozco-Santos *et al.* 2008).

Las prácticas de deshoja, despunte y cirugía buscan reducir los niveles de inóculo dentro de las plantaciones. Esta práctica consiste en la eliminación, cada una o dos semanas, de hojas o porciones de hojas con lesiones de la enfermedad en estado avanzado, al ser depositadas en el suelo la descomposición se acelera y además las esporas que son liberadas en el tejido en el suelo tienen mayor dificultad para alcanzar las hojas nuevas en la parte superior de la planta (Guzmán 2012). Esta práctica se realiza con la finalidad de reducir la principal fuente de inóculo, que lo constituye las hojas afectadas por el patógeno. Esto, debido a que las hojas enfermas dejadas en las plantas, pueden producir y liberar ascosporas hasta por 20 semanas (Gauhl 1990). Mientras que en las hojas depositadas en el suelo el patógeno se mantiene activo de 3 a 6 semanas (Guzmán y Romero 1995, Villalta y Guzmán 2005). Aunque esta práctica ayuda a reducir en gran medida el periodo de esporulación de la hoja, no logra eliminar por completo esta fuente de inóculo, debido a que aún las hojas depositadas en el suelo siguen liberando gran cantidad de esporas por un tiempo prolongado (Guzmán y Romero 1995, Villalta y Guzmán 2005)

Vargas *et al.* (2008) estudiaron el efecto de la eliminación de las 3 hojas más viejas de la planta a la floración, práctica conocida con el nombre de defoliación controlada o poda temprana. La efectividad radica en la eliminación del tejido con

lesiones jóvenes de la enfermedad, antes de que estas tengan capacidad de liberación de ascosporas. Los autores determinaron que esta práctica no reduce la capacidad de producción y crecimiento de la planta, ni la calidad de la fruta a la cosecha. Actualmente esta técnica se ha adoptado en cerca de 2000 ha de banano en Costa Rica (Guzmán 2012).

Se han realizado estudios para reducir el inóculo de Sigatoka negra en las hojas depositadas en el suelo. Guzmán *et al.* (1995), estudiaron el efecto de la aplicación de bacterias (Un-SoilR), urea y melaza, sobre la degradación de las hojas de banano y su efecto sobre la esporulación del hongo, estos autores afirmaron que no existía efecto de los tratamientos sobre la descomposición de las hojas, ni sobre la esporulación del patógeno.

Se ha estudiado el efecto del Propiconazole y el Clorotalonil sobre la esporulación del patógeno en hojas depositadas en el suelo después de la deshoja sanitaria, indicando que no existe un efecto importante de estos fungicidas (Orozco-Santos *et al.* 2002, Villalta y Guzmán 2005). Además se ha evaluado el efecto del Paraquat sobre la esporulación del patógeno, sin embargo, no se encontró efecto significativo sobre el periodo de producción y descarga de ascosporas en las hojas (Orozco-Santos *et al.* 2002).

Al estudiar el efecto antiesporulante a nivel de laboratorio de diferentes compuestos sobre *Mycosphaerella fijiensis*, Guzmán y Romero (1995) observaron que la aplicación de urea al 5 % y ceras vegetales sobre el tejido necrosado por el hongo, logra reducir la esporulación entre un 30 y 80 %. Villalta y Guzmán (2005) estudiaron el efecto antiesporulante de la urea sobre tejido foliar de banano depositado en el suelo, concluyeron que la máxima esporulación de los rastrojos de hojas de banano se registran a los 15 días después de que las hojas han sido separadas de la planta. La investigación indicó que la aplicación semanal de urea al 10 % (10 kg de urea/100 litros de agua) sobre lesiones de Sigatoka negra reduce el porcentaje de esporulación por ambos lados de la hoja, con respecto al testigo. Según los autores, la reducción en la esporulación del hongo se debe a que la urea acelera el proceso de descomposición de las hojas.

Por otro lado, es importante contar con un efectivo control de malezas dentro de las plantaciones de banano. Se ha reportado la importancia del control de las malezas de forma regular (herbicida o chapea) para un adecuado combate de la enfermedad, además se ha investigado la posibilidad de utilizar coberturas vivas de suelo de porte bajo en las plantaciones bananeras (Guzmán y Villalta 2007).

2.2.6.3. Control Genético

Según Beveraggi *et al.* (1995), de acuerdo a la respuesta a la enfermedad, los cultivares de musáceas se han clasificado en tres grupos: a. cultivares altamente resistentes en los que se da un bloqueo del proceso de infección en estadíos iniciales donde se incluyen el banano Yangambi km 5 (AAA) y los híbridos de la Fundación Agrícola Hondureña de Investigación Agrícola: FHIA 01 (AAAB), FHIA 02 (AABB), FHIA 17 (AAAA) y FHIA 23 (AAAA) que presentan tolerancia a Sigatoka negra. b. Cultivares parcialmente resistentes, donde el desarrollo de los síntomas se da de forma lenta, entre ellos los clones ABB (pera o cuadrado). c. cultivares susceptibles que se caracterizan por un desarrollo acelerado de los síntomas desde el estado de pizca hasta la presencia de tejido necrótico, ejemplo de ello son todos los clones del subgrupo Cavendish (Musa AAA) y cultivares AAB (Macho, Dominico y Manzano) también susceptibles, aunque un poco menos afectados (Orozco-Santos 1998, Jones 2000).

El mejoramiento genético de musáceas es una línea de investigación creciente en el mundo, debido a la dispersión y a la agresividad de la Sigatoka negra. Los programas de mejoramiento genético se basan en métodos convencionales como selección, cruce y evaluación de clones, sin embargo, recientemente algunos países han hecho uso de la biotecnología (cultivos de embriones, cultivo de tejidos, mutación *in vitro*, embriogénesis, fusión de protoplastos y variación somaclonal) cuyo propósito principal es realizar mejora genética contra la Sigatoka negra (Mohan y Swennen 2004, Pillay *et al.* 2012). Los programas básicos de mejora genética utilizan especies silvestres de Musa como *M. acuminata* sp. y en cultivares diploides como Paka (AA) y Pisang lilin (AA) (Mourichon *et al.* 1997).

No se conoce exactamente el mecanismo de resistencia de los bananos a la Sigatoka negra, sin embargo han sido sugeridas como posibles causas la densidad

de estomas, los niveles elevados de cera epicuticular, la producción de fitoalexinas, lignina o suberina y la resistencia a fitoalexinas producidas por el hongo (Ortiz y Vuylsteke 1994, Beveraggi *et al.* 1995). Guzmán (2013) expresa que el mejoramiento genético en la línea de resistencia a enfermedades ha encontrado resultados promisorios, con la obtención de híbridos parcialmente resistentes. Pero en detrimento de características postcosecha y calidad de fruto (propiedades organolépticas), lo que las hace de difícil comercialización y de poca aceptación por el consumidor.

2.2.6.4. Control Biológico

El control biológico utiliza organismos o el producto de su organismo para regular las poblaciones de plagas y enfermedades (Agrios 2005). Guzmán (2012) indica que el control biológico ha sido más exitoso en enfermedades de suelo que en foliares como lo es la Sigatoka negra. Según el autor, esto se relaciona a las características del filoplano, debido a que se considera como un lugar hostil para la colonización de organismos antagonistas, por las condiciones cambiantes en humedad, temperatura y la disponibilidad escasa de nutrientes. Sin embargo, existen organismos que se desarrollan en el filoplano que podrían actuar como organismos de control biológico.

En general se han realizado investigaciones con respecto al control biológico de la Sigatoka negra, entre ellas, el aislamiento de bacterias epifitas (Jiménez *et al.* 1985), hongos hiperparásitos (Esquivel 1992), efecto de sustratos sobre bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* (Ruiz 1995, Arango 2002), acción antagonista de microorganismos sobre *Mycosphaerella fijiensis* (Miranda 1996), efecto de microorganismos eficientes (ME) (Eguez 2000), hongos del filoplano con propiedades quitinolíticas (Carr 2009), efecto antagonista de bacterias cultivables contra *Mycosphaerella fijiensis* (Ceballos 2012). Se debe analizar la eficacia, rentabilidad y adopción en condiciones de campo de estos métodos de control biológico. Según Guzmán (2012) no hay estudios que comprueben la eficacia y eficiencia del control biológico en condiciones de campo a gran escala.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología y la finca experimental del Centro de Investigaciones Agrícolas La Rita de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A), ubicado en la Rita de Pococí, Limón, a una altitud de 106 msnm. En el año 2012 se registró una precipitación de 3.369 mm, con una humedad promedio de 90 % y una temperatura promedio máxima de 29,4 °C y mínima de 20,8 °C. La investigación se realizó en el periodo comprendido entre septiembre de 2012 y agosto de 2013.

3.2. Efecto de las condiciones de incubación sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra

Se realizaron una serie de experimentos con el fin de determinar los factores que pueden afectar la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en hojas de banano en condiciones de laboratorio.

3.2.1. Experimento 1. Efecto de la temperatura, tiempo de incubación y fotoperiodo sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio

3.2.1.1. Descripción de tratamientos

Las muestras recolectadas (hojas de banano con lesiones de *M. fijiensis*) fueron incubadas a diferentes periodos de tiempo, siendo estos 24, 48, 72 y 96 horas a 24 °C y 27,5 °C, utilizando fotoperiodo variable: 100 % de luz, 100 % de oscuridad y 50 de % luz/ 50 % de oscuridad. El arreglo factorial de los tratamientos fue de 2x3x4 para un total de 24 tratamientos más un testigo (Cuadro 1), con 10 repeticiones cada uno, por lo que en total fueron 250 unidades experimentales. Este experimento se realizó 2 veces.

Cuadro 1. Diseño de tratamientos para evaluar el efecto de la temperatura (°C), periodo de incubación (h) y fotoperiodo en la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en condiciones de laboratorio. CORBANA, 2013.

Tratamiento	Período de incubación (h)	T(°C)	Fotoperiodo
1*	0	ambiente	-
2	24	24	oscuridad
3	48	24	oscuridad
4	72	24	oscuridad
5	96	24	oscuridad
6	24	24	luz
7	48	24	luz
8	72	24	luz
9	96	24	luz
10	24	24	luz/osc
11	48	24	luz/osc
12	72	24	luz/osc
13	96	24	luz/osc
14	24	27,5	oscuridad
15	48	27,5	oscuridad
16	72	27,5	oscuridad
17	96	27,5	oscuridad
18	24	27,5	luz
19	48	27,5	luz
20	72	27,5	luz
21	96	27,5	luz
22	24	27,5	luz/osc
23	48	27,5	luz/osc
24	72	27,5	luz/osc
25	96	27,5	luz/osc

*En el tratamiento testigo, la descarga de esporas se hizo inmediatamente después de coleccionar las muestras, sin incubar.

3.2.1.2. Procedimiento experimental

Se recolectaron hojas con lesiones maduras de Sigatoka negra en un lote testigo de CORBANA que no recibe aplicaciones de fungicidas. Las mismas fueron transportadas al laboratorio de Fitopatología. Una vez allí, se seleccionaron lesiones

de Sigatoka negra en estado 6 (Fouré 1985), dichas lesiones se recortaron con una tijera en forma de rectángulo, obteniendo un área próxima a los 5 cm². El tejido (1 rectángulo) fue engrapado en papel bond de 11 cm X 14 cm, con el haz expuesto.

Las cámaras húmedas se construyeron con bolsas plásticas transparentes y con bodeques de toallas de papel humedecidas y amarradas con una liga en cada extremo por la parte interna de la bolsa. En el caso de los tratamientos con fotoperiodo 100 % luz se utilizaron bolsas plásticas transparentes de 14 cm X 20 cm. Cuando los tratamientos implicaban oscuridad a 24 °C se utilizó doble bolsa plástica negra para cubrir la cámara húmeda. Cuando los tratamientos debían tener fotoperiodo variable 50 % luz y 50 % oscuridad, los períodos eran de 12 horas luz 12 horas oscuridad hasta cumplir el lapso de incubación referido en los tratamientos. Los tratamientos que requirieron temperatura de 24°C fueron colocadas en las mesas de trabajo del laboratorio de Fitopatología y los tratamientos que requerían temperatura de 27,5 °C fueron colocadas dentro de una incubadora Precision Scientific a 27,5 ± 2 °C.

3.2.1.3. Descarga de ascosporas

Transcurridas las condiciones establecidas para cada tratamiento se procedió a evaluar la descarga de ascosporas. Para esto en un beaker de 500 ml de capacidad, se colocó agua desionizada y se procedió a sumergir los papeles con el tejido durante 8 minutos para la hidratación de los pseudotecios. Luego se eliminó el exceso de agua con ayuda de una toalla absorbente. Cada trozo de papel con el tejido se colocó luego sobre la parte inferior de la tapa del plato de Petri (60 mm X 17 mm) con el tejido hacia el medio agar-agua al 2% (Bacto Agar[®], Difco Laboratories), por 30 minutos con el fin de que se depositaran las ascosporas sobre este. Luego se retiró el papel y se selló herméticamente el plato de Petri con parafilm.

Los platos de Petri se incubaron durante 24 horas en oscuridad, con una temperatura de 27°C ± 2 °C y humedad relativa de 90 a 100 % en una incubadora Precision Scientific. Esta metodología de descarga de esporas en el medio agar-agua se encuentra dentro del protocolo de labores del laboratorio de Fitopatología de CORBANA (Figura 4).



- **Hidratación de las lesiones**
- Inmersión en agua desionizada.
- Período: 8 minutos



- **Descarga de ascosporas**
- Platos de Petri con agar-
agua al 2 %
- Período: 30 minutos



- **Incubación**
- Sellado con parafilm de los platos de Petri
- Incubación 24 horas en oscuridad

Figura 4. Esquema de la metodología para la descarga de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* realizada en el laboratorio de Fitopatología. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí, 2013.

3.2.2. Experimento 2. Efecto de la temperatura, tiempo de incubación, fotoperiodo y mojadura en cámara húmeda, sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio

3.2.2.1. Descripción de tratamientos

Las muestras recolectadas fueron incubadas en diferentes periodos de tiempo, siendo estos: 24 y 48 horas a 27,5 °C, utilizando fotoperiodo variable 100 % luz, 100% oscuridad y 50% luz/ 50% oscuridad y con/sin adición de mojadura. Se utilizó un arreglo factorial de tratamientos 2x2X3 para un total de 12 tratamientos, más un testigo absoluto, con 10 repeticiones cada uno, por lo que en total fueron 260 unidades experimentales. Este experimento se realizó 2 veces.

Cuadro 2. Diseño de tratamientos para evaluar el efecto de la temperatura, periodo de incubación, fotoperiodo y mojadura en la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en condiciones de laboratorio. CORBANA, 2013.

Tratamiento	Fotoperiodo	Periodo de incubación (hrs)	Mojadura
1*	0	0	0
2	luz	24	si
3	luz	24	no
4	luz	48	si
5	luz	48	no
6	oscuridad	24	si
7	oscuridad	24	no
8	oscuridad	48	si
9	oscuridad	48	no
10	luz/osc	24	si
11	luz/osc	24	no
12	luz/osc	48	si
13	luz/osc	48	no

*En el tratamiento testigo, la descarga de esporas se hizo inmediatamente después de coleccionar las muestras, sin incubar.

3.2.2.2. Procedimiento experimental

Se recolectaron hojas de banano con lesiones de Sigatoka negra, de un lote que no recibe aplicaciones de fungicidas. Las mismas fueron transportadas al laboratorio de Fitopatología. Una vez allí, se seleccionó el área sobre la hoja en donde había lesiones con visible capacidad esporulante, se recortaron con una tijera en forma de rectángulo, obteniendo un área próxima a los 5 cm². El tejido (1 rectángulo) fue adherido dejando expuesto el haz a un trozo de papel bond de 11 cm X 7 cm. Posterior a esto, según tratamientos se asperjó agua desionizada con ayuda de una bomba de émbolo (Epoca 2000) y se introdujeron dentro de las cámaras húmedas (Cuadro 2). Las cámaras húmedas se realizaron de igual forma a lo descrito en el experimento 1. Todas las cámaras húmedas fueron introducidas dentro de una incubadora Precisión Scientific a 27, 5 ± 2 °C por el tiempo definido en los tratamientos.

Transcurridas las condiciones antes mencionadas, se procedió a realizar la descarga de ascosporas, según la metodología antes descrita en el experimento 1.

3.2.3. Experimento 3. Efecto de la mojadura foliar inducida sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de campo.

3.2.3.1. Descripción de tratamientos

En el Cuadro 3, se muestran los tratamientos que fueron utilizados.

Cuadro 3. Tratamientos para determinar el efecto de la mojadura foliar inducida sobre la esporulación Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en condiciones de laboratorio. CORBANA, 2013.

Tratamiento	Período de aplicación de mojadura
1	8:00 - 9:00 am
2	3:00 - 4:00 pm
3	8:00 - 9:00 am y 3:00-4:00 pm
4	Sin mojadura inducida

3.2.3.2. Procedimiento experimental

Se identificaron mediante cinta de colores 10 plantas por tratamiento, dentro de un lote que no recibía aplicaciones de fungicidas, cuyas características de hoja 3 debían ser: lesiones en grado 3 (Fouré 1985) y candela en estadio 2 ó 4, según

escala de Brun (1963). La hoja 3 de cada planta, fue mojada diariamente con agua desionizada estéril, con ayuda de una bomba de émbolo (Epoca 2000). Las aplicaciones se realizaron hasta que las hojas desarrollaron lesiones con capacidad esporulante estadio 6, según escala Fouré (1985). El material fue recolectado y transportado al laboratorio de Fitopatología. Se seleccionaron lesiones con tijeras en rectángulo de 5 cm² que fueron adheridas con grapas metálicas a trozos de papel bond de 11 cm x 7 cm dejando expuesto el haz (1 rectángulo por trozo de papel). Las muestras fueron incubadas durante 24 horas previas a la descarga de ascosporas. Se siguió la metodología de descarga de ascosporas utilizado en el Laboratorio de Fitopatología de CORBANA y descrita previamente en este documento.

3.2.4. Variables de respuesta a estudiar en los experimentos sobre el efecto de incubación sobre la esporulación de lesiones de Sigatka negra

3.2.4.1. Esporulación de las lesiones

Se determinó la existencia de esporas en el medio de cultivo, observando al microscopio Olympus[®] modelo CH2 con un aumento de 4X por toda la placa.

3.2.4.2. Conteo de ascosporas

En caso de existir esporulación se utilizó un microscopio Olympus[®] modelo CH2, para realizar el conteo total de esporas en dos campos ópticos a 20X, ubicados en la parte central de la descarga de ascosporas (área con mayor densidad de ascosporas).

3.2.5. Modelo estadístico

El modelo estadístico que se utilizó fue el siguiente:

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

Dónde:

Y_{ij} : observación correspondiente a la j -ésima unidad experimental que recibió el i -ésimo tratamiento

μ : media general

τ_i : efecto del i -ésimo tratamiento.

ε_{ij} : error experimental o aleatorio

3.2.6. Análisis estadístico

En el “Experimento 1” la esporulación (si/no) se analizó mediante regresión logística; los tratamientos fueron comparados mediante la prueba Chi Cuadrado. Se estudió el efecto de cada uno de los factores: hora de incubación, fotoperiodo y temperatura, por separado. El total de esporas se analizó mediante un modelo lineal generalizado con distribución binomial negativa de los errores. La segunda vez que se realizó el experimento, el análisis fue el mismo, solamente que en este caso la estructura factorial se mantuvo.

En el “Experimento 2” los datos de esporulación se sometieron al análisis de regresión logística y el total de esporas, fue analizado mediante un modelo lineal generalizado con distribución binomial negativa de los errores. Se tuvo en cuenta la estructura factorial de tratamiento 3x2x2 (3 Fotoperiodos, 2 periodos de incubación, 2 niveles de mojadura). Además, se comparó el testigo con el conjunto de las combinaciones factoriales. Los datos de germinación provinieron de platos de Petri en donde hubo esporulación.

En el “Experimento 3” el análisis del porcentaje de esporulación y total de esporas fue semejante al experimento 2. El análisis de severidad de Sigatoka negra, se hizo calculando el área bajo la curva (ABC) para cada unidad de evaluación (hoja 3 de una planta), y sometiendo esta variable a análisis de varianza (Prueba de F) y comparación de medias mediante prueba de DMS.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS/STAT[®] 9.2

3.3. Búsqueda de compuestos con capacidad antiesporulante contra Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*)

3.3.1. Etapa I. Desarrollo de la metodología a utilizar

Antes de iniciar el proyecto de investigación como tal, se determinaron los factores importantes que debían ser contemplados en la metodología. Se determinó el tipo de aerógrafo que se utilizaría en las aplicaciones de los productos, también, la presión (psi) de aplicación y el volumen de aplicación del producto.

3.3.1.1. Determinación del volumen y la presión (psi) de aplicación

Se utilizó tinte vegetal rojo con el fin de teñir el agua de forma tal que fuera visible la cobertura de aplicación sobre el papel bond. Se inició con los volúmenes de 1,0 ml, 0,5 ml, 0,75 ml, 0,5 ml y 0,25 ml, esto aplicado sobre un área de 0,0080 m²

Posteriormente se realizaron pruebas modificando las presiones (psi) de 10, 20, 30 y 40 hasta determinar una cobertura total y adecuada (sin mojar en exceso) sobre el papel bond.

3.3.2. Etapa II. Evaluación *in vitro* de compuestos sobre la esporulación de Sigatoka negra

Se realizaron dos experimentos de forma individual en donde se tomaron en cuenta fertilizantes inorgánicos y ácidos grasos.

3.3.2.1. Experimento 1. Compuestos inorgánicos

Se evaluaron diferentes fertilizantes al 2 % de concentración diluidos en agua y se adicionó un coadyuvante-dispersante Microinjet[®] a 0,5 ml/L (Cuadro 4). Como testigos se utilizaron agua desionizada y una solución de urea en agua desionizada al 10 %, ambos con Microinjet[®] a 0,5 ml/L. Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento, para un total de 110 unidades experimentales. Esta prueba se realizó dos veces.

3.3.2.2. Experimento 2. Compuestos orgánicos

Se evaluaron 10 ácidos grasos al 2 % de concentración diluido en acetona, se agregó a la mezcla el coadyuvante dispersante Microinyect[®] a 0,5 ml/L. Como testigos se utilizaron agua desionizada y una solución de urea en agua desionizada al 10 %, a ambos se les adicionó Microinyect[®] a 0,5 ml/L. Se incluyó la acetona, para verificar su efecto. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento para un total de 130 unidades experimentales (Cuadro 5).

Cuadro 4. Compuestos inorgánicos (fertilizantes) estudiados para evaluar su efecto sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Experimento 1, CORBANA, 2013.

Tratamiento	Compuesto	Fórmula química	Concentración (%)	Casa/marca Comercial	Características
1	Testigo (agua)	H ₂ O	-	-	Desionizada
2	Urea ¹	CO(NH ₂) ₂	10	YaraVera™	Granular. 46 % N.
3	Nitrato de potasio	KNO ₃	2	Merck KGaA®	Grado reactivo. 99 % pureza. Cristal blanco
4	Cianamida cálcica	CaCN ₂	2	Perlka®	Grado técnico. Granular gris. Nitrógeno aminiacal: 20%, Oxido de calcio: 50 %, Magnesio: 1 %
5	Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	J.T. Baker Inc.®	Grado reactivo. 99 % pureza. Cristal blanco. CAS 07446-20-0
6	Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	2	J.T. Baker Inc.®	Grado reactivo. 97,5 % pureza. Cristal blanco. CAS 6484-52-2
7	Sulfato de cobre	Cu ₂ SO ₄ ·5H ₂ O	2	Merck KGaA®	Grado Reactivo. 99% pureza. Cristal azul
8	Nitrato de calcio	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2	Fermont	Grado reactivo. 99,5% pureza. CAS 13477-34-4. Cristal blanco
9	Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	2	Sigma Chemical Co®	Grado reactivo, cristal blanco
10	Sulfato de magnesio	MgSO ₄	2	Sigma Chemical Co®	Grado reactivo. Cristal blanco
11	Cloruro de potasio	KCl	2	Abopac	Grado técnico 0-0-60

¹/Testigo relativo del cual se conoce su efecto como antiesporulante de Sigatoka negra y otros patógenos

Cuadro 5. Compuestos orgánicos estudiados para evaluar su efecto sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Experimento 2. CORBANA, 2013.

T	Producto	Fórmula química	Concentración (%)	Casa/marca comercial	Características
1	Agua	H ₂ O	-	-	Desionizada
2	Urea ¹	CO(NH ₂) ₂	10	YaraVera™	46% N, Grado técnico.
3	Acetona	C ₃ H ₆ O	2	Productos Quiflo	Líquido transparente
4	Ácido Propiónico	C ₃ H ₆ O ₂	2		Grado reactivo, 99 % pureza
5	Ácido Caprílico	C ₈ H ₁₆ O ₂	2		Grado reactivo, 99 % pureza
6	Ácido Valérico	C ₅ H ₁₀ O ₂	2		Grado reactivo, 99 % pureza
7	Ácido Butírico	C ₄ H ₈ O ₂	2		Grado reactivo, 99 % pureza
8	Ácido caprónico	C ₆ H ₁₂ O ₂	2		Grado reactivo, 99 % pureza
9	Ácido Esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	2		Grado reactivo, 99 % pureza
10	Ácido Láurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	2		Grado reactivo, 99 % pureza
11	Ácido cáprico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	2		Grado reactivo, 99 % pureza
12	Ácido Acético	C ₂ H ₄ O ₂	2	Merck KGaA®	100% glacial, Grado reactivo
13	Ácido Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	2	Transmerquin Costa Rica	Grado técnico

¹/Testigo relativo del cual se conoce su efecto como antiesporulante de Sigatoka negra y otros patógenos

3.3.2.3. Procedimiento experimental

a. Recolección de muestras

Se recolectaron hojas con lesiones de Sigatoka negra en estadio 6 según la escala de Fouré (1985) (Figura 5B). Todas las muestras fueron colectadas en un lote testigo de CORBANA, en el cual no se realizan aplicaciones de fungicidas (Figura 5A).



Figura 5. Recolección de muestras y selección de lesiones. **(A)** Lote testigo Centro de Investigaciones Agrícolas La Rita, CORBANA. **(B)** Muestras de hojas de banano afectadas por Sigatoka negra con lesiones con capacidad esporulante, **(C)** Sacabocados de 2 mm de diámetro utilizado en selección de lesiones esporulantes, **(D)** Discos de hojas de banano con lesiones esporulantes seleccionadas para las pruebas. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí, 2013.

Los tratamientos fueron aplicados sobre 3 discos de hojas de banano con lesiones de Sigatoka negra de 2 cm de diámetro (Figura 5D), estos fueron obtenidos mediante un sacabocados de 2 cm de diámetro (Figura 5C). Los discos (3 discos por papel) fueron engrapados en papel bond de 7 cm X 11 cm, dejando expuesto el haz, tal y como se ilustra en la Figura 6.

b. Aplicación de tratamientos

Previo a la aplicación, las muestras fueron colocadas en cámara húmeda durante 24 horas para estimular la esporulación. La cámara húmeda consistió en una caja plástica con papel toalla absorbente saturado con agua. En el fondo de la misma, las muestras se colocaron dentro de la caja y se cerraron herméticamente.



Figura 6. Discos de Sigatoka negra adheridos a papel bond, sobre los cuales se aplicaron los tratamientos. (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí, 2013.

Transcurrido 24 horas en la cámara húmeda, se procedió a aplicar los discos con el producto correspondiente según el tratamiento. Para la aplicación se utilizó una mini torre de aspersión basada en el modelo de Calpouzos (1962) y un aerógrafo (Titan[®], modelo BD-132A), que sirvió de aspersor. El aerógrafo fue colocado en la parte superior de la mini torre. Se utilizó una pipeta Labnet[®] para aplicar 500 μ l (0,5 ml) del tratamiento correspondiente en la copa del aerógrafo (Figura 7 A-B).

El aerógrafo fue conectado a un compresor Emerson[®], modelo SA55NXGTE 4870, se verificó en el manómetro del compresor que la presión de aplicación fuera 20 psi. La hoja de papel bond que contenía los discos fue colocada en la parte inferior de la torre de aspersión y se procedió a realizar la aspersión del tratamiento (Figura 7B). Las muestras se dejaron en reposo durante 24 horas en las mesas de trabajo del laboratorio de Fitopatología, a una temperatura de 24°C. Posteriormente, se siguió la metodología de descarga de ascosporas utilizado en el Laboratorio de Fitopatología de CORBANA y descrita en el presente documento.

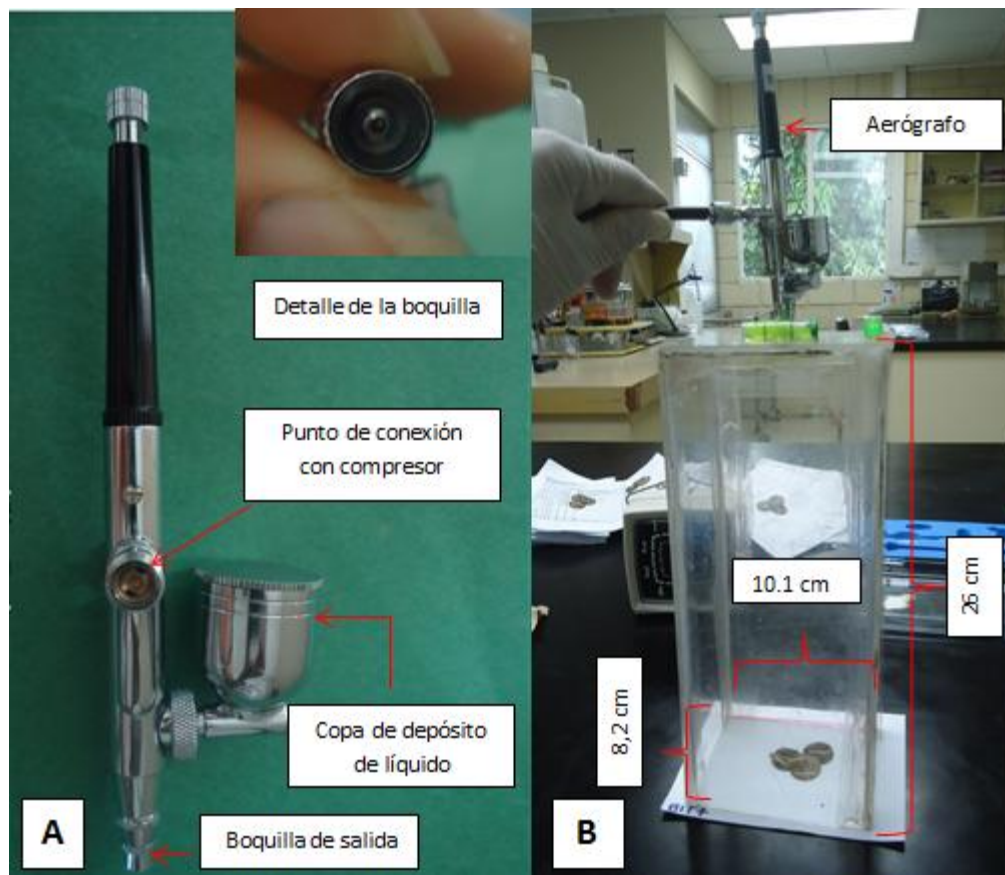


Figura 7. Equipo utilizado en la aplicación de los tratamientos. **(A)** Aerógrafo Titan[®], modelo BD-132A, **(B)** Minitorre de aspersión, basada en el modelo de Calpouzos (1962). (Gómez 2013). CORBANA, La Rita, Pococí, 2013.

3.3.3. Etapa III. Prueba de concentraciones de compuestos que presentaron mayor efecto sobre la esporulación y/o germinación de ascosporas

Se eligieron los tratamientos que presentaron un mayor efecto sobre la esporulación y/o germinación de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* para realizar una prueba a diferentes concentraciones.

3.3.3.1. Descripción de tratamientos

Se seleccionaron el cloruro de potasio (KCL), nitrato de potasio (KNO₃), cianamida cálcica (CaCN₂), ácido acético y ácido cítrico. Se incluyó la urea y el agua como testigos (Cuadro 6). Se realizaron soluciones al 5% y 10% en agua desionizada. A todos los tratamientos se les agregó 0,5 ml/L del coadyuvante dispersante Microinyect[®]. Se utilizó un total de 10 repeticiones por tratamiento,

para un total de 130 unidades experimentales (Cuadro 6). Esta prueba se realizó dos veces.

3.3.3.2. Procedimiento experimental

El procedimiento se ejecutó de igual forma al descrito en los Experimento 1 y 2 de esta tesis.

Cuadro 6. Tratamientos utilizados en prueba de concentraciones, para evaluar la capacidad antiesporulante de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre lesiones de Sigatoka negra. CORBANA 2013.

Tratamiento	Sustancia	Fórmula química	Concentración (%)	Casa/marca comercial	Características
1	Testigo (Agua)	H ₂ O	-	-	Desionizada
2	Urea ¹	CO(NH ₂) ₂	5	YaraVera™	45 % N. Grado técnico
3	Urea	CO(NH ₂) ₂	10	YaraVera™	idem
4	Cloruro de potasio	KCl	5	Abopac	Grado técnico. 0-0-60
5	Cloruro de potasio	KCl	10	Abopac	idem
6	Nitrato de potasio	KNO ₃	5	Merck KGaA®	Grado reactivo. 99 % pureza. Cristal blanco
7	Nitrato de potasio	KNO ₃	10	Merck KGaA®	idem
8	Cianamida cálcica	CaCN ₂	5	Perlka®	Grado técnico. Granular gris. Nitrógeno aminiacal: 20%, Oxido de calcio: 50 %, Magnesio: 1 %
9	Cianamida cálcica	CaCN ₂	10	Perlka®	idem
10	Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	5	Merck KGaA®	100 % glacial. Grado reactivo
11	Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	10	Merck KGaA®	idem
12	Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	5	Transmerquim Costa Rica	Grado técnico
13	Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	10	Transmerquim Costa Rica	idem

¹/Testigo relativo del cual se conoce su efecto como antiesporulante de Sigatoka negra y otros patógenos.

3.3.4. Etapa IV. Evaluación en condiciones de campo del efecto antiesporulante de compuestos seleccionados sobre lesiones de Sigatoka negra

De los compuestos evaluados en condiciones *in vitro*, se eligieron los 3 que mostraron mayor efecto sobre la esporulación o germinación de ascosporas, estos fueron evaluados en condiciones de campo.

3.3.4.1. Descripción de tratamientos

Para la evaluación se eligió el ácido acético, ácido cítrico y cianamida cálcica (CaCN_2). Se incluyó la urea y el agua como testigos. Se realizaron soluciones al 10 % en agua (Cuadro 7). A todos los tratamientos se les agregó 0,5 ml/L del coadyuvante dispersante Microinyect[®]. Se utilizó en un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 5 repeticiones por tratamiento. Cada repetición fue la hoja 6 de una planta joven de banano (2 m de altura aproximadamente) del cv. Grande Naine.

3.3.4.2. Procedimiento experimental

En un lote testigo, donde no se aplican fungicidas, se seleccionaron 5 plantas jóvenes por tratamiento (aproximadamente 2 m de altura). En estas plantas se marcó con una cinta plástica para su identificación la hoja 6 que estaba en posición horizontal y con un grado 6 de severidad, según la escala de Stover modificado por Gauhl (1989). Los tratamientos fueron aplicados en el haz de la hoja, con una bomba de émbolo de 2,5 L (Epoca 2000) que fue previamente calculada para cubrir esta zona de la hoja.

3.3.4.3. Recolección de muestras

Las evaluaciones de esporulación y germinación de ascosporas se realizaron el primer día, sexto día y noveno día después de la aplicación. De cada repetición se tomaron 5 muestras (discos 2 cm de diámetro) por día de evaluación. En total, por día de muestreo se colectaron 125 discos en los 5 tratamientos. Una vez recolectadas las muestras, fueron transportadas al laboratorio de Fitopatología en donde se realizó el procedimiento de descarga de ascosporas descrito anteriormente en este documento.

Cuadro 7. Compuestos inorgánicos y orgánicos seleccionados para evaluar en campo su efecto sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra. CORBANA 2013.

Tratamiento	Compuesto	Fórmula química	Concentración (%)	Casa/marca comercial	Características
1	Agua	H ₂ O	-	-	Desionizada
2	Urea ¹	CO(NH ₂) ₃	10	YaraVera™	Grado técnico 46-0-0
3	Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	10	Merck KGaA®	100 % glacial. Grado reactivo
4	Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	10	Transmerquim Costa Rica®	Grado técnico
5	Cianamida cálcica	CaCN ₂	10	Perlka®	Grado técnico. Granular gris. Nitrógeno amoniacal: 20%, Oxido de calcio: 50 %, Magnesio: 1 %

¹/Testigo relativo del cual se conoce su efecto como antiesporulante de Sigatoka negra y otros patógenos

3.3.5. Variables de respuesta a estudiar

Las variables de respuesta a estudiar fueron la esporulación y germinación de ascosporas que están relacionadas con la fisiología reproductiva del patógeno y se realizó mediante una inspección con microscopio Olympus® modelo CH-2 sobre los platos de Petri con agar-agua en donde se realizó la descarga de las ascosporas.

Para cada plato de Petri descargado, con ayuda del microscopio se realizó una inspección a 4 X con la finalidad de determinar la presencia de ascosporas. En caso de encontrarse ascosporas, con ayuda del microscopio a 20X se observaron tres campos ópticos y se contabilizó el número de ascosporas totales por campo óptico y el número de ascosporas germinadas y no germinadas. El conteo se realizó en la zona de mayor densidad de ascosporas.

3.3.6. Modelo estadístico

El modelo estadístico que se utilizó fue el siguiente:

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

Dónde:

Y_{ij} : observación correspondiente a la j -ésima unidad experimental que recibió el i -ésimo tratamiento

μ : *media general*

τ_i : *efecto del i -ésimo tratamiento.*

ε_{ij} : *error experimental o aleatorio*

3.3.7. Análisis estadístico

En los experimentos sobre la capacidad antiesporulantes de compuestos, los datos de esporulación (sí, no) se analizaron mediante regresión logística; los tratamientos fueron comparados mediante la prueba Chi Cuadrada de Wald (SAS/STAT® 9.2). Los datos de germinación se analizaron utilizando un modelo lineal generalizado con función de enlace logarítmica y distribución binomial negativa de los residuos. En la etapa de campo se realizó el mismo análisis en el porcentaje de esporulación y germinación registrado por día de evaluación.

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de las condiciones de incubación sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra

4.1.1. Experimento 1. Efecto de la temperatura, tiempo de incubación y fotoperiodo sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio

Los porcentajes de esporulación se presentan en Cuadro 8. Once de los 25 tratamientos no presentaron esporulación, por lo que estos no consideraron en el análisis. No se registró diferencias entre tratamientos ($P= 0,4197$) en el porcentaje de esporulación. En el factor luz se registró la mayor cantidad de tratamientos en donde hubo descarga de ascosporas 6 de 8, en el factor luz/oscuridad 4 de 8 y en oscuridad 3 de 8 de los tratamientos.

El promedio de ascosporas descargadas fue bajo y los valores oscilaron entre 4 y 41,3 ascosporas para las condiciones de 96 horas, 24 °C, en luz/oscuridad y 96 horas, 24 °C, en oscuridad, respectivamente. No se encontraron diferencias entre los tratamientos ($P= 0,8000$).

Cuadro 8. Porcentaje de esporulación de lesiones de Sigatoka negra y número de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* descargadas, según tiempo de incubación (h), temperatura (°C) y fotoperiodo en condiciones de laboratorio. Prueba 1. Fecha de muestreo: 25 enero, 2013. CORBANA, 2013.

Tratamiento	Condiciones de Incubación			Esporulación*		Número de ascosporas**	
	Incubación (h)	T (°C)	Fotoperiodo	(%)	Lógito (P) ± Error estándar	Promedio	Ln(x) ± Error estándar
Testigo	-	-	-	20	-1,39 ± 0,79	6,40	1,86 ± 0,85
2	24	24	Oscuridad	0	-	0,00	-
3	48	24	Oscuridad	10	-2,17 ± 1,05	5,10	1,63 ± 0,86
4	72	24	Oscuridad	0	-	0,00	-
5	96	24	Oscuridad	60	0,40 ± 0,64	41,30	3,72 ± 0,86
6	24	24	Luz	10	-2,20 ± 1,05	8,20	2,1 ± 0,86
7	48	24	Luz	20	-1,39 ± 0,79	9,70	2,27 ± 0,86
8	72	24	Luz	20	-1,39 ± 0,79	9,90	2,29 ± 0,86
9	96	24	Luz	10	-2,20 ± 1,05	5,70	1,74 ± 0,86
10	24	24	Luz/oscuridad	10	-2,20 ± 1,05	21,90	3,09 ± 0,86
11	48	24	Luz/oscuridad	10	-2,20 ± 1,05	8,10	2,09 ± 0,86
12	72	24	Luz/oscuridad	0	-	0,00	-
13	96	24	Luz/oscuridad	20	-1,38 ± 0,79	4,00	1,39 ± 0,86
14	24	27,5	Oscuridad	10	-2,20 ± 1,05	18,20	2,9 ± 0,86
15	48	27,5	Oscuridad	0	-	0,00	-
16	72	27,5	Oscuridad	0	-	0,00	-
17	96	27,5	Oscuridad	0	-	0,00	-
18	24	27,5	Luz	20	-1,38 ± 0,79	19,90	2,99 ± 0,86
19	48	27,5	Luz	20	-1,38 ± 0,79	22,20	3,10 ± 0,86
20	72	27,5	Luz	0	-	0,00	-
21	96	27,5	Luz	0	-	0,00	-
22	24	27,5	Luz/oscuridad	0	-	0,00	-
23	48	27,5	Luz/oscuridad	0	-	0,00	-
24	72	27,5	Luz/oscuridad	0	-	0,00	-
25	96	27,5	Luz/oscuridad	10	-2,20 ± 1,05	6,30	1,84 ± 0,86
P>Chi Cuadrada***					0,4197		0,8000

*Con base en 10 platos de Petri por tratamiento.

**Número promedio de esporas en dos campos ópticos.

*** Probabilidad calculada considerando solo los tratamientos con porcentajes inferiores a 100.

No se encontró efecto de las horas de incubación ($P= 0,6205$), temperatura ($P= 0,7623$) y fotoperiodo ($P= 0,4882$) en el porcentaje de esporulación. En el promedio de ascosporas tampoco se evidenció efecto de las horas de incubación ($P= 0,8629$), temperatura ($P= 0,6321$) y fotoperiodo ($P= 0,6132$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto del tiempo de incubación (h), fotoperiodo y temperatura ($^{\circ}\text{C}$), sobre el porcentaje de esporulación y el promedio de ascosporas de *M. fijiensis* descargadas. Fecha de muestreo: 25 enero, 2013. Prueba 1. CORBANA, 2013. .

Factor	Niveles	n	Esporulación*		Número de Ascosporas**	
			(%)	Lógito (P) \pm Error estándar	Promedio	Ln(x) \pm Error estándar
Incubación (h)	Testigo	10	20,00	-1,39 \pm 0,79	6,40	1,86 \pm 0,83
	24	60	8,30	-1,94 \pm 0,48	17,00	2,84 \pm 0,41
	48	60	10,00	-1,87 \pm 0,54	11,30	2,43 \pm 0,41
	72	60	3,30	-1,39 \pm 0,79	9,90	2,29 \pm 0,83
	96	60	16,67	-1,10 \pm 0,36	14,30	2,66 \pm 0,41
	P>Chi Cuadrada				0,6205	0,8629
Fotoperiodo	Testigo	10	20,00	-1,39 \pm 0,79	6,40	1,86 \pm 0,92
	Luz	80	12,50	-1,66 \pm 0,38	12,60	2,54 \pm 0,37
	Oscuridad	80	6,25	-1,01 \pm 0,41	21,53	3,07 \pm 0,53
	Luz/oscuridad	80	10,00	-1,94 \pm 0,48	10,10	2,31 \pm 0,46
	P>Chi Cuadrada				0,4882	0,6132
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Testigo	10	20,00	-1,39 \pm 0,79	6,40	1,86 \pm 0,85
	24	120	14,17	-1,46 \pm 0,27	12,70	2,54 \pm 0,28
	27,5	120	5,00	-1,87 \pm 0,54	16,60	2,81 \pm 0,42
P>Chi Cuadrada				0,7623	0,6321	

* Efecto de los factores en la esporulación.

** Promedio de ascosporas tomando en cuenta el efecto del factor.

Debido a que la primera vez que se realizó el experimento más del 40 % de los tratamientos no esporularon, se repitió la prueba. Los datos de esporulación y promedio de ascosporas por tratamiento se encuentran en el Cuadro 10. En este caso en todos los tratamientos se registró esporulación, no obstante no se observaron diferencias entre tratamientos en esta variable ($P= 0,4931$), ni en el promedio de ascosporas descargadas ($P= 0,9997$).

Cuadro 10. Porcentaje de esporulación de lesiones de Sigatoka negra y promedio de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* descargadas según tiempo de incubación (h), temperatura (°C) y fotoperiodo en laboratorio. Prueba 2. Fecha de muestreo: 18 abril, 2013. CORBANA, 2013.

Tratamiento	Condiciones de Incubación			Esporulación*		Número de ascosporas**	
	Incubación (hrs)	T (°C)	Fotoperiodo	(%)	Lógito (P) ± Error estándar	Promedio	Ln(x) ± Error estándar
Testigo	-	-	-	60	0,40 ± 0,64	67,70	4,22 ± 0,85
2	24	24	Oscuridad	80	-1,39 ± 0,08	73,60	4,30 ± 0,85
3	48	24	Oscuridad	50	0,00 ± 0,63	38,40	3,65 ± 0,85
4	72	24	Oscuridad	50	0,00 ± 0,63	51,10	3,93 ± 0,85
5	96	24	Oscuridad	50	0,00 ± 0,63	75,20	4,32 ± 0,85
6	24	24	Luz	60	0,40 ± 0,64	57,00	4,04 ± 0,85
7	48	24	Luz	60	0,40 ± 0,64	83,20	4,42 ± 0,85
8	72	24	Luz	50	0,00 ± 0,63	87,30	4,46 ± 0,85
9	96	24	Luz	30	-0,84 ± 0,69	51,30	3,93 ± 0,85
10	24	24	Luz/oscuridad	60	0,40 ± 0,64	48,50	3,88 ± 0,85
11	48	24	Luz/oscuridad	70	0,85 ± 0,69	121,50	4,79 ± 0,85
12	72	24	Luz/oscuridad	50	0,00 ± 0,63	56,30	4,03 ± 0,85
13	96	24	Luz/oscuridad	50	0,00 ± 0,63	94,60	4,55 ± 0,85
14	24	27,5	Oscuridad	30	-0,84 ± 0,69	26,80	3,29 ± 0,85
15	48	27,5	Oscuridad	60	0,40 ± 0,64	102,30	4,63 ± 0,85
16	72	27,5	Oscuridad	40	-0,40 ± 0,64	53,50	3,98 ± 0,85
17	96	27,5	Oscuridad	60	0,40 ± 0,64	53,20	3,97 ± 0,85
18	24	27,5	Luz	50	0,00 ± 0,63	28,30	3,34 ± 0,85
19	48	27,5	Luz	40	-0,40 ± 0,64	94,10	4,54 ± 0,85
20	72	27,5	Luz	10	-2,19 ± 1,05	11,60	2,45 ± 0,85
21	96	27,5	Luz	40	-0,40 ± 0,64	50,80	3,93 ± 0,85
22	24	27,5	Luz/oscuridad	50	-0,40 ± 0,64	52,30	3,74 ± 0,85
23	48	27,5	Luz/oscuridad	40	0,00 ± 0,63	43,60	3,77 ± 0,85
24	72	27,5	Luz/oscuridad	30	-0,84 ± 0,69	70,30	4,25 ± 0,85
25	96	27,5	Luz/oscuridad	70	0,85 ± 0,69	84,60	4,44 ± 0,85
P>Chi Cuadrada***					0,4931		0,9997

*Con base en 10 platos de Petri por tratamiento.

**Número promedio de ascosporas en dos campos ópticos.

*** Probabilidad calculada considerando solo los tratamientos con porcentajes inferiores a 100.

Por su parte los factores horas de incubación (P= 0,177), fotoperiodo (P= 0,2511) no evidenciaron efecto sobre el porcentaje de esporulación, mientras que la temperatura (P= 0,0499) si demostró efecto sobre esta variable, siendo mayor el porcentaje a los 24 C En el promedio de ascosporas no se demostró efecto de la incubación (P= 0,6588), fotoperiodo (P= 0,7874) y temperatura (P= 0,3443) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto del tiempo de incubación (h), fotoperiodo y temperatura (°C), sobre el porcentaje de esporulación de lesiones de Sigatoka negra y el promedio de ascosporas descargadas. Prueba 2. Fecha de muestreo: 18 abril, 2013. CORBANA, 2013.

Factor	Niveles	n	Esporulación*		Número de Ascosporas**	
			(%)	Lógito (P)±Error estándar	Promedio	Ln(x)±Error estándar
Incubación (h)	Testigo	10	60	0,40 ± 0,64	67,70	4,22 ± 0,85
	24	60	53,9	0,16 ± 0,28	43,38	3,77 ± 0,35
	48	60	55,2	0,21 ± 0,26	73,70	4,30 ± 0,35
	72	60	36	-0,58 ± 0,3	46,99	3,85 ± 0,35
	96	60	50	0,00 ± 0,27	66,02	4,19 ± 0,35
P>Chi Cuadrada				0,1770	0,6508	
Fotoperiodo	Testigo	10	60	0,40 ± 0,64	67,70	4,22 ± 0,85
	Luz	80	40,6	-0,38 ± 0,25	48,91	3,89 ± 0,30
	Oscuridad	80	52,9	0,12 ± 0,24	65,37	4,00 ± 0,30
	Luz/oscuridad	80	52,6	0,11 ± 0,23	54,60	4,18 ± 0,30
P>Chi Cuadrada				0,2511	0,7874	
Temperatura (°C)	Testigo	10	60	0,40 ± 0,64	67,70	4,22 ± 0,85
	24	120	55,4	0,22 ± 0,19	66,02	4,19 ± 0,25
	27,5	120	42	-0,32 ± 0,2	47,47	3,86 ± 0,25
P>Chi Cuadrada				0,0499	0,3443	

* Efecto de los factores en la esporulación

** Promedio de ascosporas tomando en cuenta el efecto del factor

4.1.2. Experimento 2. Efecto del tiempo de incubación, fotoperiodo y mojadura en cámara húmeda, sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio

En el Cuadro 12 se muestran los resultados de este experimento. No se encontraron diferencias entre los tratamientos evaluados para las variables porcentaje de esporulación ($P= 0,2944$) y promedio de ascosporas ($P= 0,4264$).

Cuadro 12. Porcentaje de esporulación de lesiones de Sigatoka negra y número de ascosporas de *M. fijiensis* descargadas bajo condiciones fotoperiodo, incubación y mojadura. Fecha de muestreo: 13 marzo y 9 abril, 2013. CORBANA, 2013.

Tratamiento	Condiciones de tratamientos			Esporulación*		Número de ascosporas**	
	Fotoperiodo	Incubación (h)	Mojadura	(%)	Lógito (P)±Error estándar	Promedio	Ln(x)±Error estándar
1	-	-	-	70	0,85 ± 0,49	54,25	3,99 ± 0,43
2	Luz	24	si	75	1,09 ± 0,52	214,84	5,37 ± 0,43
3	Luz	24	no	65	0,69 ± 0,47	115,60	4,75 ± 0,43
4	Luz	48	si	80	1,39 ± 0,56	169,80	5,13 ± 0,43
5	Luz	48	no	40	-0,40 ± 0,46	40,60	3,70 ± 0,43
6	Oscuridad	24	si	70	0,85 ± 0,49	130,45	4,87 ± 0,43
7	Oscuridad	24	no	80	1,39 ± 0,56	117,16	4,76 ± 0,43
8	Oscuridad	48	si	70	0,85 ± 0,49	108,85	4,69 ± 0,43
9	Oscuridad	48	no	60	0,40 ± 0,46	80,85	4,40 ± 0,43
10	Luz/oscuridad	24	si	80	1,39 ± 0,56	159,60	5,07 ± 0,43
11	Luz/oscuridad	24	no	70	0,85 ± 0,49	126,75	4,84 ± 0,43
12	Luz/oscuridad	48	si	75	1,10 ± 0,52	124,45	4,82 ± 0,43
13	Luz/oscuridad	48	no	55	0,20 ± 0,45	70,70	4,26 ± 0,43
P>Chi Cuadrada***					0,2944		0,4264

*Con base en 20 platos de Petri por tratamiento. Experimento realizado 2 veces.

**Número promedio de ascosporas en dos campos ópticos.

*** Probabilidad calculada considerando solo los tratamientos con porcentajes inferiores a 100.

Con respecto a la influencia de las variables fotoperiodo, incubación y mojadura (Cuadro 13), solamente la mojadura tuvo efecto en los tratamientos para la variable de esporulación ($P= 0,0368$). Al agrupar los resultados de acuerdo a las condiciones de mojadura (si/no) el porcentaje de esporulación aumentó 5 % cuando

se adiciona mojadura foliar en la cámara húmeda con respecto al testigo y 13 % más que los tratamientos sin mojadura. Por su parte, los periodos de incubación evaluados no evidenciaron efecto ($P= 0,1263$) sobre los tratamientos; sin embargo, se debe mencionar que el periodo de incubación de 24 h obtuvo un porcentaje de esporulación 4 % mayor al testigo y 10 % mayor al periodo de 48 h.

El promedio de ascosporas fue mayor ($P= 0,0327$) en los tratamientos con mojadura (147,5) en relación con los tratamientos sin adición de mojadura (85,8). Sin embargo, en los tiempos de Incubación ($P= 0,0789$) y fotoperiodo ($P= 0,9702$) no hubo efecto (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto del tiempo de incubación (h), fotoperiodo y mojadura, sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra y promedio de ascosporas descargadas. Fecha de muestreo: 13 marzo y 9 abril, 2013. CORBANA, 2013.

Factor	Niveles	n	Esporulación *		Ascosporas**	
			Esporulación (%)	Lógito (P)±Error estándar	Promedio	Ln(x)±Error estándar
Incubación (h)	Testigo	20	70	0,85 ± 0,49	54,25	3,99 ± 0,43
	24	120	74	1,03 ± 0,21	140,46	4,95 ± 0,18
	48	120	64	0,59 ± 0,20	90,07	4,50 ± 0,18
	P>Chi Cuadrada				0,1263	
Fotoperiodo	Testigo	20	70	0,85 ± 0,49	54,25	3,99 ± 0,43
	Luz	80	66	0,67 ± 0,25	114,39	4,74 ± 0,22
	Oscuridad	80	71	0,87 ± 0,25	107,69	4,68 ± 0,22
	luz/oscuridad	80	71	0,88 ± 0,25	115,50	4,75 ± 0,22
	P>Chi Cuadrada				0,8057	
Mojadura	Testigo	20	70	0,85 ± 0,49	54,25	3,99 ± 0,43
	Sin humedad	120	62	0,51 ± 0,20	85,8	4,45 ± 0,18
	Con humedad	120	75	1,11 ± 0,21	147,5	4,99 ± 0,18
P>Chi Cuadrada				0,0368		0,0327

* Efecto de los factores en la esporulación.

** Promedio de ascosporas tomando en cuenta el efecto del factor.

4.1.3. Experimento 3. Efecto de la mojadura foliar inducida sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de campo

No existió diferencia en el porcentaje de esporulación ($P= 0,3737$) ni en el promedio de ascosporas descargadas ($P= 0,7889$) entre los tratamientos, los resultados obtenidos se observan en el Cuadro 14. Ninguno de los tratamientos sobrepasó el 50 % de esporulación, siendo el máximo 46 % en el tratamiento en donde se indujo mojadura foliar en la mañana y tarde, en este mismo tratamiento también se observó la mayor descarga de ascosporas, aunque como se indicó anteriormente sin diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos.

Cuadro 14. Porcentaje de esporulación y número de ascosporas descargadas por lesiones de Sigatoka negra desarrolladas en hojas de banano sometidas a diferentes niveles de mojadura foliar. CORBANA, 2013.

Tratamiento	Adición de mojadura***		Esporulación*		Ascosporas**	
	am	pm	Lógito (P) ± Error estándar (%)	Promedio	Ln(x) ± Error estándar	
1	si	no	38	-0,49 ± 0,21	41,60	3,73 ± 0,34
2	no	si	36	-0,57 ± 0,21	39,49	3,67 ± 0,34
3	si	si	46	-0,16 ± 0,20	60,90	4,10 ± 0,33
4	no	no	35	-0,62 ± 0,21	49,87	3,90 ± 0,33
P>Chi Cuadrada			0,3737			0,7889

*Con base en 100 platos de Petri por tratamiento

**Número promedio de ascosporas en dos campos ópticos

*** am indica aplicación de mojadura en lapso de 7:00 - 8:00 y pm de 3:00- 4:00

La severidad de la Sigatoka negra (Figura 8) fue mayor en el tratamiento donde se indujo mojadura por la mañana y tarde hasta aproximadamente el día 18, luego del cual el testigo (sin mojadura inducida) mostró la mayor severidad y se mantuvo así hasta el final de las evaluaciones. El tratamiento de mojadura inducida por la mañana obtuvo los valores más bajos de severidad al final de las evaluaciones. Durante las evaluaciones el máximo diario de precipitación alcanzado fue de 35 mm y ocurrió el día 22 de mayo.

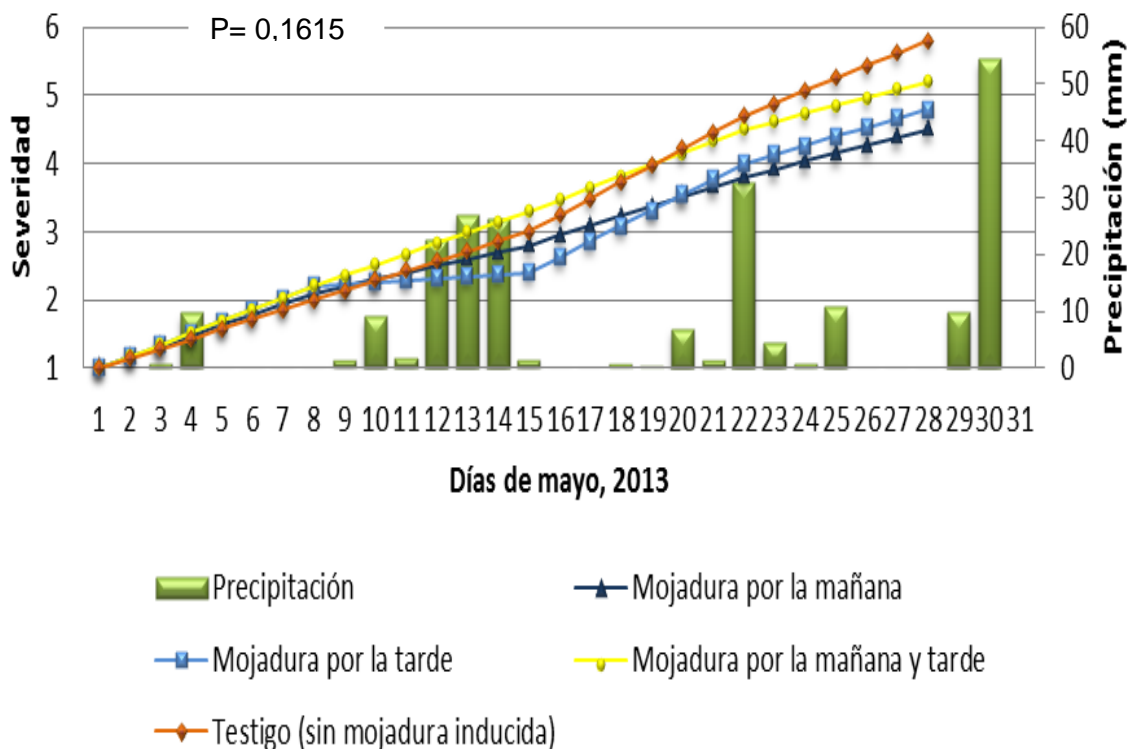


Figura 8. Severidad promedio de la Sigatoka negra en hojas de banano, sometidas a diferentes regímenes de mojadura foliar artificial en campo. El testigo corresponde a las condiciones naturales de mojadura en el periodo experimental y a los tratamientos se les indujo mojadura artificial mediante la aspersión de agua con una bomba manual. La probabilidad fue obtenida mediante el análisis del área bajo la curva. CORBANA, 2013.

4.2. Búsqueda de compuestos con capacidad antiesporulante contra Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*)

4.2.1. Etapa I. Desarrollo de la metodología a utilizar

En la Figura 7 se muestra la cobertura de los diferentes volúmenes aplicados sobre el papel bond (1 ml \approx 1.250 L / ha , 0,75 ml \approx 937 L / ha , 0,5 ml \approx 625 L / ha y 0,25 \approx 312 L / ha). Para la aplicación se utilizó un aerógrafo con boquilla lineal BD-132^a. Las aplicaciones iniciales se realizaron a 20 libras por pulgada cuadrada (psi). En general, los volúmenes de 1 ml y 0,75 ml mostraron una buena cobertura en el papel; sin embargo, se formaban gotas grandes sobre

el área tratada que mojaban de forma excesiva (Figura 9. AB). El volumen de 0,2 ml demostró una cobertura desigual, observándose en el borde áreas blancas que indicaban zonas en donde la aplicación no fue efectiva (Figura 9. D). El volumen intermedio de 0,5 ml (500 μ l) fue el que mostró una adecuada cobertura sobre el papel bond, quedando solo una pequeña película de producto en las paredes internas de la torre de aspersión.

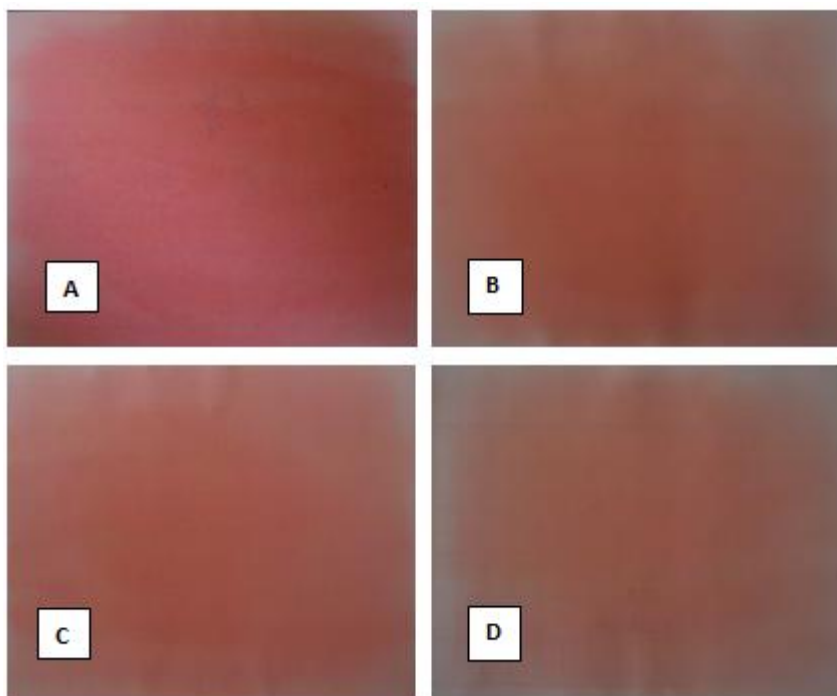


Figura 9. Cobertura de aplicación con diferentes volúmenes a 20 psi. **(A)** volumen 1 ml (1250 L/ ha), **(B)** volumen 0,75 ml (937 L/ ha), **(C)** volumen 0,5 ml (625 L/ ha), **(D)** volumen 0,2 ml (312 L/ ha). CORBANA, 2013.

En la Figura 10, se muestra la cobertura obtenida a un volumen de 0,5 ml a 20, 30 y 40 psi. En general, para las presiones de 30 y 40 psi el producto se encontraba en el centro del papel bond, dejando los bordes desprovistos del producto (Figura 10. BD). Al utilizar una presión de 20 psi, la cobertura fue adecuada, no se observó residuo abundante de producto en las paredes de la torre (Figura 8. A).

De acuerdo con los resultados de estas dos pruebas; para la evaluación *in vitro* de los diferentes compuestos antiesporulantes se utilizó un volumen de 0,5 ml del producto a una presión de 20 psi.

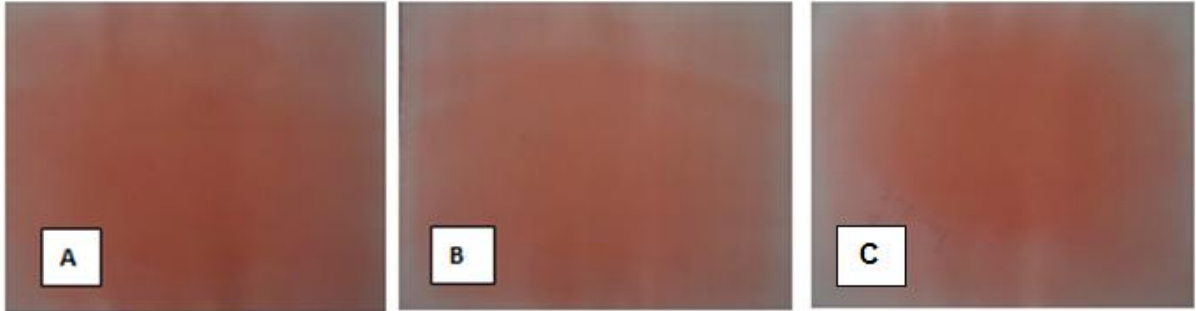


Figura 10. Cobertura de la aplicación con diferentes presiones, utilizando 0,5 ml. **(A)** 20 psi, **(B)** 30 psi, **(C)** 40 psi. CORBANA, 2013.

4.2.2. Etapa II. Evaluación *in vitro* de compuestos sobre la esporulación de *Mycosphaerella fijiensis*

Los porcentajes de esporulación y de germinación obtenidos en el experimento 1 (compuestos inorgánicos) y el experimento 2 (compuestos orgánicos), se presentan en el Cuadro 15. Cuando los tratamientos evaluados obtuvieron 100 % de esporulación y/o germinación se excluyeron de la comparación con los demás tratamientos.

En general, no hubo diferencias en el porcentaje de esporulación ($P \geq 0,5786$) y germinación ($P \geq 0,1757$) entre los tratamientos evaluados. No obstante la carencia de diferencias estadísticas, algunos de los tratamientos redujeron ligeramente la esporulación de las lesiones. Por ejemplo, en el experimento 1 (compuestos inorgánicos), las reducciones con respecto al testigo fueron de 15 % en el nitrato de calcio y cloruro de potasio, 10 % en el nitrato de potasio y sulfato de zinc, 5 % en la cianamida cálcica y sulfato de amonio. Por otra parte el sulfato de cobre no influyó sobre la esporulación, mientras que el nitrato de amonio y sulfato de magnesio fomentaron la esporulación del patógeno, obteniendo porcentajes de 10 y 5 % respectivamente, por encima del testigo. En el experimento 2 (compuestos orgánicos), la reducción de la esporulación en

términos porcentuales con respecto al testigo fue de 10 % en la urea, ácido cáprico, ácido acético y ácido cítrico. El ácido caprílico, ácido butírico y ácido láurico no redujeron la esporulación, mientras que el ácido propiónico, ácido valérico, ácido caprónico y ácido esteárico obtuvieron valores por encima del testigo en 10 % y la acetona en un 20 %.

El número de ascosporas descargadas para determinar el porcentaje de germinación de cada tratamiento osciló entre 942 y 2.338 en el experimento 1 y entre 911 y 1.732 en el experimento 2. En el experimento 1 (compuestos inorgánicos), la reducción del porcentaje de germinación de las ascosporas descargadas con respecto al testigo osciló entre 0,3 % y 23,4 %. En los tratamientos de cianamida cálcica (23,4 %), sulfato de cobre (15,6 %) y nitrato de potasio (15 %) fue en los que se observó una mayor reducción en la germinación. En el experimento 2, en los tratamientos testigo, acetona, ácido propiónico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido esteárico, ácido láurico, ácido cáprico, ácido acético, ácido cítrico, la germinación fue del 100 %, por lo que no se compararon con los demás tratamientos. La reducción del porcentaje de germinación con respecto al testigo osciló entre 1 % y 5 %, los valores más altos de reducción se obtuvieron con el ácido caprílico (4 %) y con la urea (5 %).

Cuadro 15. Efecto de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre la esporulación de lesiones de *Sigatoka* negra y la germinación de ascosporas de *M. fijiensis* en condiciones de laboratorio. Experimento 1 y 2. CORBANA, 2013.

Experimento	Tratamiento	ESPORULACIÓN*		GERMINACIÓN**		
		(%)	Lógito (P) ± Error estándar	Esporas descargadas	(%)	Ln(x) ± Error estándar
1	Testigo (agua)	85	1,73 ± 0,63	1.343	100,0	4,6
	Urea	74	1,03 ± 0,52	1.331	95,2	4,56 ± 0,07
	Nitrato de potasio	75	1,10 ± 0,52	942	85,0	4,44 ± 0,07
	Cianamida cálcica	80	1,39 ± 0,56	2.185	76,6	4,34 ± 0,07
	Sulfato de zinc	75	1,10 ± 0,52	2.338	97,0	4,57 ± 0,07
	Nitrato de amonio	95	2,94 ± 1,03	1.599	94,6	4,55 ± 0,07
	Sulfato de cobre	85	1,73 ± 0,63	1.844	84,4	4,44 ± 0,07
	Nitrato de calcio	70	0,85 ± 0,49	1.251	98,3	4,59 ± 0,07
	Sulfato de amonio	80	1,39 ± 0,56	1.603	99,7	4,60 ± 0,07
	Sulfato de magnesio	100	-	2.182	94,3	4,55 ± 0,07
	Cloruro de potasio	70	0,85 ± 0,49	1.380	90,2	4,50 ± 0,07
	P>Chi Cuadrada***			0,5786		
2	Testigo (agua)	80	1,38 ± 0,79	972	100	4,61
	Urea	70	0,85 ± 0,69	1.076	95	4,55 ± 0,03
	Acetona	100	-	1.772	100	4,61
	Ácido propiónico	90	2,19 ± 1,05	1.463	100	4,61
	Ácido caprílico	80	1,38 ± 0,79	911	96	4,57 ± 0,03
	Ácido valérico	90	2,19 ± 1,05	1.366	100	4,61
	Ácido butírico	80	1,38 ± 0,79	1.732	99	4,59 ± 0,03
	Ácido caprílico	90	2,19 ± 1,05	1.485	100	4,6
	Ácido esteárico	90	2,19 ± 1,05	807	100	4,6
	Ácido láurico	80	1,38 ± 0,79	1.292	100	4,6
	Ácido cáprico	70	0,84 ± 0,69	1.543	100	4,6
	Ácido acético	70	0,84 ± 0,69	1.173	100	4,6
	Ácido cítrico	70	0,84 ± 0,69	973	100	4,6
P>Chi Cuadrada***			0,9217			0,6697

*Con base en 20 placas de Petri por tratamiento en sustancias inorgánicas y 10 en sustancias orgánicas.

** Con base en los platos de Petri en donde hubo esporulación.

***Probabilidad calculada considerando solo los tratamientos con porcentajes inferiores a 100 %.

Los ácidos grasos del experimento 2 fueron disueltos en acetona.

4.2.3. Etapa III. Prueba de concentraciones de compuestos que presentaron efectos sobre la esporulación y/o germinación de ascosporas

En la prueba de concentraciones no hubo diferencias entre los tratamientos en el porcentaje de esporulación ($P= 0,2737$) ni en el porcentaje de germinación ($P= 0,1836$). No obstante, todos los tratamientos evaluados disminuyeron el porcentaje de esporulación con respecto al testigo con un efecto más destacado de la cianamida cálcica al 5 % y el ácido cítrico al 10 % (Cuadro 16).

Cuadro 16. Efecto de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre la esporulación de lesiones de *Sigatoka* negra y la germinación de ascosporas de *M. fijiensis* en condiciones de laboratorio. CORBANA, 2013.

Tratamiento	ESPORULACIÓN *		GERMINACIÓN**		
	(%)	Lógitto (P) ± Error estándar	Ascosporas descargadas	(%)	Ln(x) ± Error estándar
Testigo (agua)	65	0,62 ± 0,47	1.116	100	4,6
Urea (5 %)	45	-0,2 ± 0,45	779	97	4,57 ± 0,11
Urea (10 %)	40	-0,4 ± 0,45	1.205	96	4,56 ± 0,11
Cloruro de potasio (5 %)	50	0,00 ± 0,48	736	90	4,50 ± 0,10
Cloruro de potasio (10 %)	60	0,40 ± 0,46	1415	99	4,60 ± 0,09
Nitrato de potasio (5 %)	40	-0,40 ± 0,46	847	75	4,32 ± 0,12
Nitrato de potasio (10 %)	40	-0,40 ± 0,46	774	99	4,59 ± 0,11
Cianamida cálcica (5 %)	20	-1,38 ± 0,56	330	100	4,61
Cianamida cálcica (10 %)	50	0,00 ± 0,44	719	66	4,19 ± 0,10
Ácido acético (5 %)	45	-0,20 ± 0,45	848	94	4,54 ± 0,11
Ácido acético (10 %)	50	0,00 ± 0,44	504	87	4,47 ± 0,10
Ácido cítrico (5 %)	40	-0,40 ± 0,46	916	93	4,53 ± 0,11
Ácido cítrico (10 %)	30	-0,84 ± 0,49	714	80	4,39 ± 0,13
P>Chi Cuadrada***		0,3145			0,1836

*Con base en 20 placas de Petri por tratamiento. Experimento se realizó dos veces

**Con base en los platos de Petri donde hubo esporulación.

*** Probabilidad calculada considerando solo los tratamientos con porcentajes inferiores a 100.

El número máximo de ascosporas descargadas fue de 1.116 en el testigo con 100 % de germinación, mientras que el valor mínimo fue de 330 ascosporas en el tratamiento al 5 % de cianamida cálcica también con 100 % de germinación. Algunos tratamientos redujeron el porcentaje de germinación, aunque como se mencionó antes sin diferencias significativas con el testigo. Los tratamientos más destacados fueron la cianamida cálcica al 10 %, el nitrato de potasio al 5 %, el ácido cítrico al 10 % y el ácido acético al 10 %.

4.2.4. Etapa IV. Evaluación en condiciones de campo de la capacidad antiesporulante de compuestos orgánicos e inorgánicos sobre Sigatoka negra

Se llevaron al campo los tres compuestos que presentaron los mejores resultados en condiciones de laboratorio: cianamida cálcica, ácido acético y ácido cítrico. Los datos de esporulación y germinación, se muestran en el Cuadro 17. Para el día 1 (24 horas después de la aplicación de los tratamientos), el porcentaje de esporulación ($P < 0,0001$), para el ácido acético fue de 8 %, mientras que para el testigo fue de 76 % en la misma variable. Solamente el ácido acético difirió en esta variable respecto a los demás tratamientos. Con respecto a la variable de germinación, los porcentajes iguales al 100 % no fueron comparados (testigo). El día 1, el total de ascosporas descargadas oscilaron entre 390 (ácido acético) y 1.815 (cianamida cálcica). A su vez la cianamida cálcica logró reducir la germinación a un 86 % ($P = 0,0025$) con respecto al testigo.

Al sexto día, el ácido acético mostró nuevamente reducción ($P < 0,0001$) en el porcentaje de esporulación respecto a un 96 % en el testigo. En la germinación de las ascosporas no se obtuvieron diferencias entre los tratamientos ($P = 0,3981$). Sin embargo en el total de ascosporas descargadas, el ácido acético obtuvo el valor más bajo con 263 con respecto al testigo que obtuvo 2.792 ascosporas (Figura 11).

Cuadro 17. Efecto de la urea, ácido acético, ácido cítrico y cianamida cálcica sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra y la germinación de ascosporas de *M. fijiensis* en condiciones de campo. CORBANA, 2013.

Tratamientos	Días después de la aplicación	ESPORULACIÓN *		GERMINACIÓN**		
		%	Lógito (P) ± Error estándar	Ascosporas descargadas	%	Ln(x) ± Error estándar
Testigo (agua)	Día 1	76	1,15 ± 0,47 ^b	1.528	100	4,61
Urea		68	0,75 ± 0,43 ^b	1.165	99	4,60 ± 0,03 ^b
Ácido acético		8	-2,44 ± 0,74 ^a	390	93	4,53 ± 0,08 ^{ab}
Ácido cítrico		64	0,58 ± 0,42 ^b	1.739	100	4,61
Cianamida cálcica		64	0,58 ± 0,42 ^b	1.815	86	4,45 ± 0,03 ^a
Pr>Chi Cuadrada***		<0,0001		0,0025		
Testigo (agua)	Día 6	96	3,18 ± 1,02 ^b	2.792	99	4,6 ± 0,01
Urea		92	2,44 ± 0,74 ^b	3.297	99	4,59 ± 0,01
Ácido acético		12	-1,99 ± 0,62 ^a	263	100	4,61
Ácido cítrico		100	-	4.345	99	4,6 ± 0,01
Cianamida cálcica		80	1,39 ± 0,5 ^b	2.286	96	4,57 ± 0,01
Pr>Chi Cuadrada***		<0,0001		0,3981		
Testigo (agua)	Día 9	76	1,15 ± 0,47 ^{bc}	3.913	100	4,61
Urea		68	0,75 ± 0,43 ^b	2.984	99	4,6 ± 0,01 ^a
Ácido acético		12	-1,99 ± 0,62 ^a	192	100	4,61
Ácido cítrico		96	3,18 ± 1,02 ^c	6.738	100	4,61
Cianamida cálcica		68	0,75 ± 0,43 ^b	1.768	97	4,58 ± 0,01 ^a
Pr>Chi Cuadrada***		<0,0001		0,5434		

*Con base en 25 platos de Petri por día de análisis por tratamiento

**Con base en los platos de Petri donde hubo esporulación

*** Probabilidad calculada considerando solo los tratamientos con porcentajes inferiores a 100

Letras iguales en una misma columna no difieren entre si

Nueve días después de la aplicación de tratamientos, los porcentajes de esporulación oscilaron entre 12 % y 96 %, evidenciando diferencias entre tratamientos ($P < 0,0001$). Con el ácido acético solo el 12 % de las lesiones esporularon, mientras que el testigo alcanzó el 76 %. Se registraron diferencias estadísticas entre los tratamientos urea y cianamida cálcica en el porcentaje de germinación ($P = 0,0586$) y el ácido acético obtuvo la menor cantidad de ascosporas descargadas (192) (Cuadro 17, Figura 11).

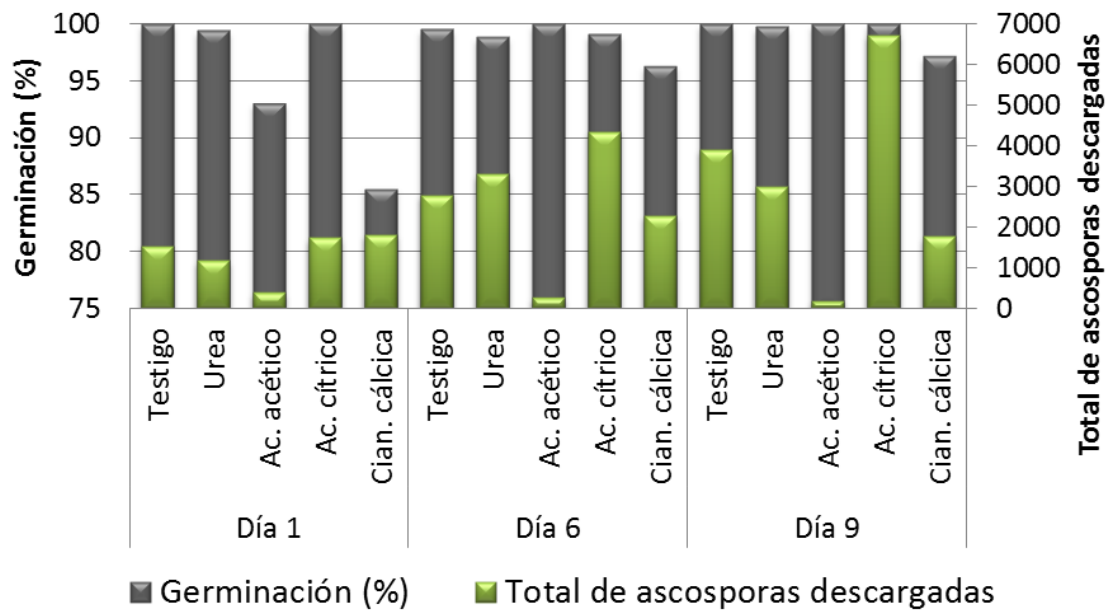


Figura 11. Descarga y germinación de ascoporas de *M. fijiensis* de lesiones de Sigatoka negra aplicadas con diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos. CORBANA, 2013.

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto de las condiciones de incubación sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra

El tiempo, el fotoperiodo y la temperatura de incubación en laboratorio, no mejoraron la capacidad de esporulación de lesiones de Sigatoka negra colectadas en campo. Muchos de los tratamientos con diferentes combinaciones de estos factores ni siquiera esporularon. Este hecho evidencia que las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrolla la enfermedad en el campo tienen una gran influencia en la capacidad de la liberación de ascosporas de las lesiones al final del ciclo de la misma. Lo anterior por cuanto, aunque la esporulación del patógeno se realizó en condiciones de laboratorio, el ciclo de la enfermedad se desarrolló en el campo y es allí específicamente en donde las condiciones climáticas interfieren. En el periodo en que se realizaron las pruebas, las condiciones ambientales predominantes fueron secas, en las semanas previas a la recolección del material se registraron bajas precipitaciones (promedio semanal de 20 mm) Gauhl (1994), determinó una reducción en la producción de inóculo de *M. fijiensis* durante los meses menos lluviosos del año en el Caribe costarricense. Esto obedece a que el agua juega un papel predominante en el desarrollo del patógeno, tanto para la formación y fertilización del pseudotecio (Jones 2000, Bennett y Arnerson 2003, Marín *et al.* 2003), como para la liberación de las ascosporas (Meredith y Lawrence 1973, Stover 1980).

A pesar de la baja esporulación en los experimentos efectuados en el laboratorio, en el campo, donde se colectaron las lesiones de Sigatoka negra la infección en la plantación era muy fuerte. Esto podría deberse a que *M. fijiensis* también produce gran cantidad de conidios en lesiones jóvenes, aun en periodos secos, cuando las condiciones climáticas son menos favorables (Jacome *et al.* 1991, Jones, 2000, Marín *et al.* 2003) y aunque su capacidad de dispersión es más limitada son también muy infecciosos. Guzmán (2003) indica que los conidios pueden jugar un rol muy importante en la prevalencia de la enfermedad durante

periodos de baja precipitación, en los que se forma abundante rocío en horas de la madrugada y las primeras horas de la mañana.

Al analizar la influencia de los factores por separado tiempo, fotoperiodo y temperatura de incubación, con respecto a la esporulación, los mejores porcentajes se obtuvieron con el testigo (sin incubación en cámara húmeda). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Posada y Nobmann (2001) los cuales encontraron que las mayores descargas de ascosporas se encontraron al procesar las muestras sin cámara húmeda cuando imperaba la época de invierno y con 24 horas en cámara húmeda cuando era época de verano. Por otro lado, se demostró que al aumentar las horas de incubación hasta 96 horas no aumentó de forma considerable la esporulación ni el número promedio de ascosporas, esto puede deberse a que la mayoría de pseudotecios se encuentran maduros desde que fueron recolectados en el campo, por lo que 24 horas en cámara húmeda es suficiente para estimular la descarga de las ascosporas. Posada y Nobmann (2001), afirman que los pseudotecios que no descargan por estar inmaduros requieren de unas pocas horas de insolación (luz y temperatura) para alcanzar su estado óptimo de descarga. Otros autores, recomiendan someter las muestras a 48 horas de cámara húmeda (Arroyo *et al.* 1993, González 1999, Dupont s.f), aunque no muestran datos que sustenten esta recomendación.

Con el aumento de la humedad en cámara húmeda se busca que la mayoría de los pseudotecios estén maduros al realizar la descarga. También es posible que el efecto de la cámara húmeda predisponga los pseudotecios a absorber el agua en la etapa de hidratación en la metodología de descarga. En el experimento 2, la combinación de factores que presentó mejores resultados en el aumento de la esporulación de las lesiones fueron: (i) el fotoperiodo luz, 48 horas de incubación y con mojadura; (ii) fotoperiodo oscuridad, 24 horas de incubación sin mojadura; (iii). foliar fotoperiodo de luz/ oscuridad con 24 horas de incubación con mojadura. El factor común en la mayoría de los casos fue la mojadura, de hecho cuando se evaluaron los factores por separado la mojadura obtuvo valores de esporulación y promedio de esporas por encima del testigo. Esto podría deberse a que la adición de humedad proporciona condiciones de humedad relativa idóneas dentro de la

cámara húmeda para la maduración de los pseudotecios. En la literatura se encuentran estudios sobre los porcentajes de humedad relativa óptimos para que se de la germinación de las ascosporas y conidios, no así para la esporulación de las lesiones. Jacome *et al.* (1991), realizaron estudios para determinar el efecto de la temperatura y la humedad relativa en la germinación y desarrollo del tubo germinativo de *M. fijiensis*, y determinaron que los rangos óptimos van desde 92-100 % para la germinación de conidios y de 98- 100 % en el caso de las ascosporas a temperatura de 26,5 °C.

Con respecto al fotoperiodo, ninguno de los regímenes aplicados logró sobrepasar el porcentaje de esporulación del testigo. En los tres fotoperiodos estudiados (100 % luz, 100 % oscuridad, 50 % luz/ 50 % oscuridad) se obtuvo esporulación. Thal *et al.* (1991), estudiaron la fluctuación de ascosporas en el aire a diferentes horas del día y encontraron una mayor concentración de ascosporas en el día comparado a la noche, durante la mayor parte del año. Sin embargo, no se puede analizar este factor por separado dada su interacción con otros factores ambientales en las condiciones de campo.

Los mejores resultados en la esporulación con respecto a la temperatura, se alcanzaron con el testigo, seguido de los 24 °C y por último 27,5°C. Al medir la temperatura interna en las cámaras húmedas que se encontraban a una temperatura ambiente de 24 °C se encontró que esta no varió. Por otro lado, al medir la temperatura interna de las cámaras húmedas colocadas en la incubadora a una temperatura ambiente de 27,5 °C, estas alcanzaron valores de hasta 29 °C. Gauhl (1994) explica que las temperaturas entre 26-28 °C tienen un marcado efecto sobre los procesos de infección, germinación, penetración del patógeno y liberación de inóculo. Esto podría suponer que la exposición prolongada del tejido con lesiones de Sigatoka negra a temperaturas de 29 °C tenga un efecto negativo sobre la esporulación, al generar un efecto desecante sobre el pseudotecio.

La aplicación de mojadura foliar por el haz de la hoja en condiciones de campo no mejoró la esporulación de las lesiones de Sigatoka negra. Lo anterior pudo obedecer a que la mayor cantidad de infecciones se producen por el envés y muy posiblemente la fertilización del protopseudotecio también ocurre

principalmente en el envés. En consideración de lo anterior, la aplicación de agua por el haz sería poco eficiente en mejorar la fertilidad de las lesiones y plantea la posibilidad de que la aplicación de agua por el envés sea más efectiva. También es posible que una aplicación tan dirigida no sea suficiente para mejorar la fertilidad de las lesiones y que esto responda en su defecto a modificaciones ambientales de mayor magnitud como la precipitación y variaciones sustanciales en la humedad relativa.

Las aplicaciones de agua por el haz de la hoja tampoco afectaron el desarrollo de la enfermedad, lo cual demuestra en cierta forma que el comportamiento de esta responde a fenómenos ambientales de mayor magnitud, de manera similar a lo descrito previamente para el caso de la esporulación de las lesiones. Es posible que si se logra modificar el comportamiento de la enfermedad con la modificación de la humedad de la hoja en forma dirigida podría lograrse también una mejor esporulación de las lesiones. En este sentido, la aplicación de mojadura por el envés es un factor que sería conveniente estudiar, tal y como se discutió anteriormente.

5.2. Búsqueda de compuestos con capacidad antiesporulante contra *Sigatoka* negra (*Mycosphaerella fijiensis*)

No se encontraron efectos mayores al 20 % de reducción de esporulación de lesiones de *Sigatoka* negra y germinación de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* con los diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos estudiados en condiciones de laboratorio. Éste reducido efecto podría deberse a que se evaluaron al 2 % de concentración y que se podría requerir dosis más altas para aumentar el efecto. Lo anterior se confirmó cuando algunos compuestos se estudiaron en condiciones de laboratorio a concentraciones de 5 % y 10 % y se observaron reducciones en esporulación entre el 50 % y 80 %. No obstante, parte de los objetivos del estudio fue seleccionar compuestos activos a bajas concentraciones.

Algunos de los compuestos evaluados al 2 % estimularon la esporulación de las lesiones de *Sigatoka* negra (sulfato de magnesio, nitrato de amonio, ácido

propiónico, ácido valérico, ácido caprónico y ácido esteárico). Sutton y Khonga (1991) observaron resultados similares en *Gibberella zeae* con los ácidos acético propiónico y la urea. Estos autores indican que en bajas concentraciones el ácido propiónico y la urea estimulan la producción de peritecios debido a que el patógeno utiliza los iones acetato como fuente de carbono para su crecimiento. Sin embargo, a concentraciones de 5 % la urea fue tóxica para el hongo con reducciones de hasta 97 % en la producción de peritecios, mientras que el ácido acético y el ácido propiónico redujeron la producción entre 85-100 %.

En la presente investigación se confirmó el efecto antiesporulante de la urea sobre las lesiones de Sigatoka negra, aunque en menor magnitud a lo observado por Villalta y Guzmán (2005), quienes observaron hasta un 80 % de reducción en la esporulación con la aplicación de una solución de urea al 10 %. Mondal y Timer (2003) también informan de una reducción del 90 % en el desarrollo de pseudotecios y producción de ascosporas *Mycosphaerella citri* en condiciones de laboratorio con una solución de urea al 5 % (p/v). Sutton *et al.* (2000) encontraron en manzana una reducción de ascosporas de *Venturia inaequalis* (50 % a 66 %) en las trampas de esporas al aplicar la hojarasca con una solución de urea al 5 %..

Respecto al mecanismo de acción de la urea como antiesporulante, Guzmán *et al.* (1995), indican que posiblemente se deba a cambios en la presión osmótica dentro de las células que causaría deshidratación de los pseudotecios e imposibilitaría la liberación de las ascosporas. Por su parte, Crosse *et al.* (1968), sugieren que una vez degradada la urea los incrementos en el pH pueden haber estimulado el aumento de *Pseudomonas* fluorescentes y otros organismos ureasa activos que puedan inhibir la producción pseudotecial y por ende la esporulación. La urea contiene 46 % de nitrógeno y se pudo observar en la investigación que la mayoría de compuestos que contenían este elemento (con la excepción del nitrato de amonio) causaron algún efecto de reducción en la esporulación.

Los resultados de laboratorio de la presente investigación también se pudieron ver afectados por la técnica de aplicación, con la cual se produjo una aspersión sobre las lesiones sin causar una mojadura completa de las mismas y es conocido que el efecto de la urea y otros compuestos está asociado a un buen

humedecimiento de las lesiones. No obstante, eso fue parte del estudio, pues se buscaba compuestos que pudieran tener efectos significativos con una aplicación similar a una aspersión de fungicidas aérea o terrestre, en la cual no se propicia humedecimiento ni escurrimiento del caldo de aplicación sobre el tejido.

En la prueba de campo, el ácido acético al 10 % mostró un fuerte efecto de inhibición de la esporulación (más de 85 % de reducción en la esporulación hasta 9 días después de la aplicación), superior al resultado obtenido con la urea cuyo efecto alcanzó como máximo un 10 % de inhibición en esporulación Khonga y Sutton (1991), observaron resultados similares en campo con el ácido acético y el propiónico, con los cuales lograron reducir la producción de peritecios de *Giberella zae* de 98 % a 100 % comparado con 50 % de la urea. En otros estudios se ha evaluado el efecto fungicida y fungistático del ácido acético. Samaniego *et al.* (2008a), determinó que las concentraciones de 8,3 y 83,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido acético tienen efecto fungicida sobre esclerocios de *Phymatotrichopsis omnívora*, mientras que concentraciones de 1,7 a 8,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido acético presentan efectos fungistáticos para los esclerocios del patógeno. Además, Samaniego *et al.* (2008b), evaluaron la sobrevivencia de esclerocios de *P. omnívora* a soluciones de ácido acético y sulfúrico, así como a los cambios de pH. Estos autores determinaron que la muerte de los esclerocios se induce en soluciones amortiguadoras de pH 4 y 5 en concentración de ácido acético a 16,6 y 3,4 nM L^{-1} .

El efecto antiesporulante que presenta el ácido acético contra *Mycosphaerella fijiensis*, puede ser explicado con lo expuesto por Samaniego *et al.* (2008b) los cuales indican que en el caso de los esclerocios de *P. omnívora* se da una reacción en la permeabilidad de las paredes y membranas celulares, debido a que pH bajos induce en los hongos la expresión de genes que codifican metabolitos secundarios y excreción de enzimas. El ácido acético induce la muerte celular (apóptica) al afectar la permeabilidad de la membrana y asociarse a la histoina (Peñalva y Arst 2002, Ribeiro *et al.* 2006). Por su parte, Uhre y Arneborg (1988), explican que el ácido acético pertenece a los ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta; los autores exponen que los AGV en pequeñas cantidades y a pH según el organismo, sirve como nutrimento. También

indican que el ácido acético tiene acción biocida, ya que puede penetrar y cambiar el pH interno en las células, al acidificar el citosol de las mismas. Debido a estas afirmaciones, se podría pensar que los cambios celulares que se dan en las paredes del pseudotecio imposibilitan la viabilidad del mismo para que se dé la liberación de las ascosporas.

En condiciones de laboratorio el ácido cítrico al 10 % mostró hasta un 50 % de inhibición en la esporulación de lesiones de Sigatoka negra respecto al testigo a las 24 horas de la aplicación. Similares resultados, aunque de menor magnitud (16 % de inhibición en la esporulación) se observaron en condiciones de campo a las 24 horas de la aplicación; no obstante, en la evaluación hecha a los 6 y 9 días después de la aplicación las lesiones tratadas con este compuesto esporularon más que el testigo. En otras palabras, el ácido cítrico estimuló la liberación de inóculo desde las lesiones y este efecto inverso demuestra la importancia de evaluar el efecto antiesporulante de los compuestos a diferentes tiempos después de la aplicación, ya que como en el presente caso podrían ocurrir variaciones en la reacción del patógeno a lo largo del tiempo.

Algunos compuestos redujeron el porcentaje de germinación de ascosporas de *M. fijiensis*, principalmente el sulfato de cobre, nitrato de potasio, la cianamida cálcica y el ácido acético. Este efecto pudo obedecer a que el producto utilizado logró penetrar las paredes del pseudotecio y afectar la viabilidad de algunas ascosporas. Es de destacar que la cianamida cálcica fue constante en el efecto causado a la germinación de las ascosporas en todos los experimentos realizados, aunque en magnitudes bajas (máximo 34 % de inhibición en la germinación). Los componentes principales de la cianamida cálcica son el nitrógeno amoniacal en un 20 % y el óxido de calcio en un 50 %. Spotts *et al.* (1997), encontraron que la aplicación de cal redujo la producción de pseudotecios y ascosporas en hojas de manzanas afectadas por la sarna (*Venturia inaequalis*). Estos autores atribuyen este efecto al aumento de Ca y de pH, lo que hace que los tejidos se descompongan más rápidamente y se atrofen los pseudotecios.

6. CONCLUSIONES

Del presente estudio surgen las siguientes conclusiones:

1. Variaciones en el tiempo, la temperatura y el fotoperiodo de incubación no afectan la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio.
2. La adición de mojadura a las lesiones de Sigatoka negra y su posterior incubación por 24 horas aumenta la esporulación de las lesiones y la cantidad de ascosporas descargadas en condiciones de laboratorio.
3. La adición de mojadura diariamente en campo por el haz de la hoja, durante el desarrollo de las lesiones de Sigatoka negra, no contribuye a mejorar la esporulación de las mismas al final del ciclo de la enfermedad
4. Los compuestos: sulfato de cobre, ácido caprílico, ácido butírico, y ácido láurico al 2 % de concentración no presentan efecto antiesporulante sobre lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio.
5. Los compuestos: urea (10%), nitrato de potasio, cianamida cálcica, sulfato de zinc, nitrato de calcio, sulfato de amonio, cloruro de potasio, ácido acético, ácido cítrico, ácido caprílico al 2 % de concentración presentan algún efecto antiesporulante sobre lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio
6. Los compuestos: sulfato de magnesio, nitrato de amonio, ácido propiónico, ácido valérico, ácido caprílico, ácido esteárico al 2 % de concentración estimulan la esporulación de lesiones de Sigatoka negra en condiciones de laboratorio.
7. En la prueba de laboratorio con concentraciones de 5 % y 10 %, la urea, cloruro de potasio, nitrato de potasio, cianamida cálcica, ácido acético y ácido cítrico reducen la esporulación respecto al testigo (entre 8 % con el

cloruro de potasio al 10 % y un 70 % con la cianamida cálcica al 5 %) de las lesiones de Sigatoka negra.

8. En la prueba de campo el ácido acético al 10 % redujo significativamente (90 %, 87,5 %, 84,2 % de inhibición respecto al testigo a los 1, 6 y 9 días respectivamente después de la aplicación) la esporulación de lesiones de Sigatoka negra. Este constituye el primer informe del efecto de este ácido graso volátil sobre la esporulación de la Sigatoka negra.
9. El descubrimiento del efecto antiesporulante del ácido acético sobre la Sigatoka negra abre toda una nueva gama de oportunidades de investigación para tratar de introducir este compuesto dentro de las estrategias del manejo integrado de la enfermedad. Lo anterior es sobretodo destacable si consideramos la baja o nula toxicidad del ácido acético a los seres vivos, su bajo costo y su bajo impacto ambiental.

7. RECOMENDACIONES

1. La metodología utilizada en la presente investigación (mini torre de aspersión y aerógrafo) para evaluar a nivel de laboratorio el efecto antiesporulante de los compuestos fue adecuada; sin embargo, se podrían mejorar la calidad de la aplicación si se adiciona a la mezcla un compuesto antideriva que mejore el peso de la gota y aumente el tamaño de la misma, de tal forma que se pueda recuperar más producto en el blanco.
2. Realizar pruebas en campo con el ácido acético asperjado a hojas con lesiones de Sigatoka negra con equipos tipo motobomba e inclusive aplicaciones aéreas, mismos que son utilizados para las aplicaciones de fungicidas contra la Sigatoka negra.
3. Realizar combinaciones entre los compuestos que presentaron efecto sobre la esporulación y/o germinación, estudiados en esta investigación para determinar si los efectos combinados mejoran el efecto de los productos individuales.
4. Realizar investigación para evaluar la posibilidad de combinar el ácido acético con fungicidas utilizados en los programas de combate de la Sigatoka negra, ya que esto podría contribuir a mejorar la eficacia de los mismos.

8. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Florida, USA. 1936 p.
- Anselm, R. 2012. Update: Black Sigatoka. (en línea) Consultado 25 ag 2013. Disponible en www.news.dm/update-black-Sigatoka-2/.
- Arango, ME. 2002. Alternativas de manejo para el control biológico de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Moleret) en el cultivo del banano (*Musa AAA*). p. 130-134. In Memorias XV Reunión Internacional ACORBAT, Cartagena de Indias, Colombia. Oct 27-Nov 02 de 2002.
- 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.
- Arroyo, T. 1993. Method to test the sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* (Black Sigatoka) to Propiconazole in vitro. Division Plant Protection. BU Disease Control. P 8-23.
- 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 2 may 2013. Disponible en <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/BlackSigatokaEspanol.aspx>
- Beveraggi, A; Mourichon, X; et Sallé, G. 1995. Etude compareé des premières étapes de l'infection chez les bananiers sensibles et résistants infectés ´par le *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladie des raies noires. Canadian Journal of Botany. 73:1328-1337.
- 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 Parí

- Calpouzos, L. 1962. A precision spray technique for evaluating oil for Sigatoka disease on individual banana leaves in the field. *Phytopathology*. 50:69-72.
- Calvo, C; Romero, R. 1998. Evaluación del gradiente de dispersión de la enfermedad de la Sigatoka negra del banano (*Musa AAA*). Corporación Bananera Nacional. *CORBANA* 23(49): 51-56
- Carlier, J; Fouré, E; Gauhl, F; Jones, JR; Lepoivre, P; Mourichon, X; Pasberg-Gauhl, C; Romero, RA. 2000. Black leaf streak. In: *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. Wallingford, Oxon, UK. p 37-79.
- Carr, C. 2009. Aislamiento y selección de hongos antagonistas en plantaciones de banano para el combate biológico de la Sigatoka negra. Tesis Lic. Ing. Agr. ITCR, San Carlos, Costa Rica. 87 p.
- Cayón, G; Lozada, J; Belalcázar, S. 1991. Estudios comparativos sobre la actividad fotosintética de clones de plátano (*Musa AAB* y *ABB*, Simmonds) en Colombia. pp. 549-558. En: *Memorias Reunión Acorbat 91*, Villahermosa (México). Corbana, San José (Costa Rica).
- Ceballos, I; Mosqueras, S; Ángulo, M; Mira, J. J; Argel, L. E; Uribevelez, D; Romero Tabarez, M; Orduz-Peralta, S; Villegas, V. 2012. Cultivable bacteria population associated with leaves of banana and plantain and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Environmental Microbiology*.
- Champion, J. 1968. *El plátano*. Trad. F Palomeque. 1 ed. Barcelona, España. Editorial BLUME. p 17-18.
- Chuang, T; Su, H. 1988. Physiological study of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. *Memoirs of the College of Agriculture, National Taiwan University* 28:19-26.
- Churchill, A. 2010. *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*. 22 p.

Conde, L; Grijalva, R; Canto, B; Manzo, G; Canul, M; James, A. 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). 2010. Contribución económica y social del sector bananero. San José, CR (en línea). Consultado 23 may. 2012. Disponible en http://www.corbana.co.cr/est_empleo.shtml

Crosse, J; Constance, M; Burchill, R. 1968. Changes in the microbial population of apple leaf associated with the inhibition of the perfect stage of *Venturia inaequalis* after urea treatment. *Ann. Appl. Biol.* 61: 203-216.

Crous, P; Groenewald, J; Braun, A; Mourichon, X; Carlier, J. 2002. Integrating morphological and molecular data sets in *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on Musa. Proc. Int. Workshop *Mycosphaerella* Leaf Spot Dis. Bananas, 2nd. In press. for Banana. *Annals of Botany* 100: 1073-1084.

Crous, P; Mourichon, X. 2002. *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. Nov. causal agent of eumusae leaf spot disease of banana. *Sydowia* 54:35-43.

Deighton, F. 1976. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI *Pseudocercospora* Speg *Pantospora* Cif. And *Cercoseptoria* Petr. *Mycol* 140:1-168.

Dupont. s.f. Sigatoka negra y amarilla. Técnicas mejoradas para manejo e identificación. Boletín técnico, Dupont agroquímicos. S.A. 17 p.

- Eguez, V. 2000. Control biológico de Sigatoka negra en banana, con microorganismos eficientes, en dos zonas del trópico de Cochabamba. Proyecto CONCADE. Development Alternatives INC. Bolivia.
- Esquivel, R. 1992. Algunos deuteromicetos hiperparásitos de *M. fijiensis* Moleret, Panamá. Institutos de Investigaciones Agropecuarias de Panamá. (IDIAP). 12 p.
- Flores, E; Soto, M; Bolaños, R. 1985. Variación estacional del sistema foliar de cinco clones de banano. Turrialba. Vol. 35, No. 4, pp 339-346.
- Fouré, E. 1985. Black leaf streak Disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet), Study of the symptoms and stages of the disease in Gabón. IRFE, París.
- Fouré, E; Moreau, A. 1992. Contribution á l'étude épidémiologique de cercosporiose noire dans la zone Mangou au Cameroon de 1987 á 1989. Fruits 47: 3-16
- Gauhl, F. 1989. Untersuchungen zur Epidemiologie und Ökologie der Schwarzen SigatokaKrankheit (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) an Kochbananen (*Musa* sp.) in Costa Rica. PhD thesis, University of Gottingen, Germany
- Gauhl, F. 1990. Epidemiología y ecología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (*Musa* sp) en Costa Rica, UPEB. Panamá, Panamá. 126 p.
- 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

- González, M. 1999. Metodología para la manipulación y cultivo in vitro de *Mycosphaerella fijiensis*. Hoja técnica CATIE. Manejo Integrado de Plagas No. 30.
- Guzmán M, A. Jiménez, R. Vargas & R. Romero. 2000. Caracterización de cepas de *M. fijiensis*, causante de la Sigatoka negra, con menor sensibilidad a fungicidas triazoles. P. 64 in Reunión ACORBAT 2000. Memorias.
- Guzmán, M. 2002. Situación de la Sigatoka negra en Costa Rica y opciones para el manejo de la enfermedad. Acorbat. Memorias XV reunión. Medellín Colombia (en línea). Citado 26 jun, 2013. Disponible en http://www.musalit.org/pdf/IN030027_es.pdf
- Guzmán, M. 2003. Epidemiología de la Sigatoka negra y el sistema de preaviso biológico. p 26-27 en Taller INIBAP, Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Guayaquil. Ecuador.
- Guzmán, M. 2003. Impacto de *Mycosphaerella fijiensis* en los trópicos: Situación de la Sigatoka negra en banano y plátano en el trópico americano. p 11-12 en Taller INIBAP, Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Guayaquil. Ecuador.
- Guzmán, M. 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. p. 83- 91. En: Memorias XVII Reunión Internacional ACORBAT, 2006. Acorbat- Acafruta, Joinville, Brasil.
- Guzmán, M. 2012. Control biológico y cultural de la Sigatoka negra. 45 Congreso Brasileiro sobre Fitopatología, Manaus. Tropical Plant Pathology 37 (suplemento) (en línea). Consultado: 25 agosto, 2013. Disponible en: http://media.wix.com/ugd/805a0f_e3dab4225ec1c08d4d738455cddd0a57.pdf

- Guzmán, M; Calvo, C; Obando, R; Vargas, R. 1995. Evaluación preliminar del efecto de la aplicación de bacterias, melaza y urea sobre la degradación de hojas de banano y la esporulación de la Sigatoka negra en hojas a nivel de suelo. En: Informe anual 1995. Departamento de Investigación. (Corporación Bananera Nacional). CORBANA S:A: San José, Costa Rica. p 54.
- Guzmán, M; Orozco-Santos, M; Pérez, L. 2013. Las enfermedades Sigatoka de las hojas de banano: dispersión, impacto y evolución de las estrategias de manejo de América latina y el Caribe. XX Reunión internacional de asociación para la cooperación en búsqueda y desenvolvimiento integral de Musáceas (banano y plátano). Fortaleza, Brasil. 98-116p
- Guzmán, M; Romero, R. 1995. Determinación del efecto antiesporulante de diferentes compuestos sobre *Mycosphaerella fijiensis*. En: Informe anual 1994. Departamento de Investigación. (Corporación Bananera Nacional). CORBANA S:A: San José, Costa Rica. p.46.
- Guzmán, M; Romero, R. 1995. Efecto de la aplicación de ceras y urea sobre la esporulación de Sigatoka negra. En: Informe anual 1995. Departamento de Investigación. (Corporación Bananera Nacional). CORBANA S:A: San José, Costa Rica, p 64-64
- Guzmán, M; Villalta, R. 2005. Aporte de la deshoja sanitaria y prácticas adicionales en el control de la Sigatoka negra en banano (*Musa AAA*). En: 1er Congreso Científico-Técnico Bananero Nacional. Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A.). Resumen p 12.
- Heslop-Harrison, J; Schwaracher, T. (2007). Domestication, Genomics and Future for Banana. *Annals of Botany* 100: 1073-1084.
- Hidalgo, M; Tapia, A; Rodríguez, W; Serrano, E. 2005. Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y la transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery). *Agronomía Costarricense* 30(1): 35-41.

- Jacome, 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
- Jiménez, C; Riveros, A; Pocasangre, L; Delgado, E; Rosales, F; Gonzáles, O; Romero, D. 2009. Efecto de la inoculación de dos tipos de semilla de bananos con dos aislados de *Trichoderma atroviride* en fase de vivero sobre el desarrollo de las plantas en campo bajo Sigatoka Negra. *Revista UDO Agrícola* 9 (2): 403-413.
- Jiménez, J.M; Galindo, J:J; Ramirez, C. 1985. Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *Diformis* mediante bacterias epífitas. Páginas 105- 109 in: Proc. ACORBAT meeting, 7th. J. J. Galindo and R. Jaramillo, eds. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
- Jones, D. 2000. Sigatoka. p. 79-92. In: Diseases of banana, Abacá and Enset. Jones, D. (editor). CAB international. Wallingford, UK.
- Kema, G; Yu, F; Rijkenberg, M; Shaw, R; Baayen. 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathol.* 86:777-786.
- Khonga, E; Sutton, J. 1991. Effects of acetic acid, propionic acid and urea on inoculum production by *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. *Mycol. Res.* 95 (4): 409-412.
- Leach, R. 1964. Reporto on Investigations Into de Cause and Control of the New Banana Disease in Fiji, Black Leaf Streak. Council Papers Fiji 38, Suva.
- Lepoivre, P; Busogoro, J; Etame, J. 2002. Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions. pp.151-159. En: Proceedings of the 2nd International workshop on *M. fijiensis* leaf spot diseases. San José (Costa Rica).

- Lepoivre, P; Busogoro, J; Etame, J; Eldadrami, A; Carlier, J; Harelimana, G; Mourichon, X; Panis, B; Riveros, S; Sallé, G; Strosse, H; Swennen, R. 2003. Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions, pp. 151-159. In: Jacome L; Lepoivre P; Marin D; Ortiz R; Romero R; Escalant JV (eds). Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 Mayo 2002. INIBAP, Roma.
- Lorenzo, C; Prendes, C; Rodríguez, MA; Blesa H. 1978. Contribución al estudio de la platánea canaria estomas y su distribución en la epidermis foliar. Anat. y Fisiol. 37:11-12.
- Manzo, S; Guzmán, G; Rodríguez, G, James, A; Orozco, S. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. Revista Mexicana de Fitopatología. 23(1): 87-96.
- Marín, D; Romero, R; Guzmán, M; Sutton, T. 2003 Black Sigatoka: An increasing treat to banana cultivation. Plant Disease 87 (3): 208-222.
- Marín, D; Romero, R. 1998. El combate de la Sigatoka negra In: Divulgación científica al servicio del productor bananero nacional. Revista CORBANA. San José. CR. p 104-129.
- Martínez, I; Guzmán, M. 2010. Sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a fungicidas. Pag. 227-238. In Informe Anual 2009, Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, CR.
- 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, D; Lawrence, J. 1970. Black leaf streak disease of banana (*Mycosphaerella fijiensis*); susceptibility of cultivars. Tropical Agriculture 47: 273-287.

- Meredith, D; Lawrence, J; Firman, I. 1973. Ascospore release and dispersal on black leaf streak disease of banana (*Mycosphaerella fijiensis*). Trans. Br. Mycol. Soc. 60: 547-554.
- Miranda, J. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, colocados en el interior y exterior de la planta de banano. Mag. Sci. Tesis, CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Mohan, S; Swennen, R. 2004. Banana improvement: celular molecular biology, and induced mutations. Science Publishers. The University of Wisconsin-Madison. Enfield , NH, USA. 382 p.
- Mondal, S; Timmer, L. 2003. Effect of urea, CaCO₃ and dolomite on pseudothecial development and ascospores production of *Mycosphaerella citri*. Plant Disease. 87(5) 478-483.
- Morelet, M. 1969. Mycromycetes du Var et d' ailleurs (2me Note). Ann.Soc. Sci. Nat. Archeol. Toulon Var, 21: 104-106
- Mourichon, X; Carlier, J; Fouré, E. 1997. Enfermedades de Sigatoka: Raya negra de la hoja (Sigatoka negra) Enfermedad de Sigatoka (Sigatoka amarilla). Hoja divulgativa N°8, PROMUSA.
- Mourichon, X; Zapater, M. 1990. Obtention in vitro du stade *Mycosphaerella fijiensis* forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. Fruits. 45: 553-557.
- Mulder, J; Stover, R. 1976. *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. Transaction of the British Mycological Society 67:77-82.
- Murillo, G; Guzmán, M. 2007. Programa de asistencia técnica en el manejo de la Sigatoka negra. Pag. 123-126. En Informe Anual 2005. Dirección de investigaciones, Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A). San José, Costa Rica.

- Orozco, M; Orozco, J; Pérez, O; Manzo, G; Farias, J; Da Silva, V. 2008. Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en banano y plátanos. *Tropical Plant Pathology* 33(3):1-10.
- Orozco-Santos, M. 1998. Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. Folleto técnico No. 1. 95 p.
- Orozco-Santos, M; Farios, L; Manzo, S; Guzmán, S. 2002. Manejo integrado de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) del banano, en el trópico seco de México. Memorias de la XV Reunión ACORBAT 2002. Cartagena de Indias, Colombia. p 119-124.
- Orozco-Santos, 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.
- Orozco-Santos, M; Orozco, J. 2004. La Sigatoka negra en bananos y plátanos: el caso de México. En: Publicación Especial, XVI Reunión ACORBAT. Oaxaca, México p 70-78
- Orozco-Santos, M; Orozco, J; García, K; Vázquez, J; Manzo, G. 2010. Situación actual de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en México y perspectivas de control. VII Simposio Brasileiro sobre Bananicultura. APTA. Sao Paulo, Brasil. P 336-356
- Ortiz, R; López, A; Ponchner, S; Segura, A. 2007. El cultivo de Banano. EUNED. San José, CR. p 17.
- Ortiz, R; Vuylsteke, D. 1994. Inheritance of black Sigatoka disease resistance in plantain banana (*Musa* spp). *Theoretical and Applied Genetics* 89:146-152

- Parnell, M; Burt, A; 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.
- Peñalva, M; Arst, H. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 426-446.
- Pillay, M; Ude, G; Kole, C. 2012. *Genetics Genomics and Breeding of Bananas.* Edited by M. Pillay, G. Ude and C Cole. Enfield, NH. USA. Science Publishers. 350 p.
- Posada, I; Nobman, B. 2001. Obtención de una descarga abundante de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* "in vitro" mediante el manejo de las variables involucradas. *Universidad de Magdalena. ASCOLFI.* 27(1): 2-3.
- Ramsey, M; Daniels, J; Anderson, D. 1990. Effects of Sigatoka negra leaf spot (*M. fijiensis*) on fruit yields, field ripening and greenlife on bananas in North Queensland, *Sci. Hortic.* 41: 305-313.
- Rhodes P.L. 1964. A new banana disease in Fiji. *Commonwealth Phytopathology News* 10:38-41
- Ribeiro, F; Corte-Real, M; Johansson, M. 2006. Characterization of AND in Yeast Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide, Acetic Acid and Hyperosmotic Shock. *Molecular of Biology of the cell:* 4584-4591.
- Rodríguez, A; Cayón, G. 2008. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Protección de cultivos. Agronomía Colombiana.* 26(2), 256-265.

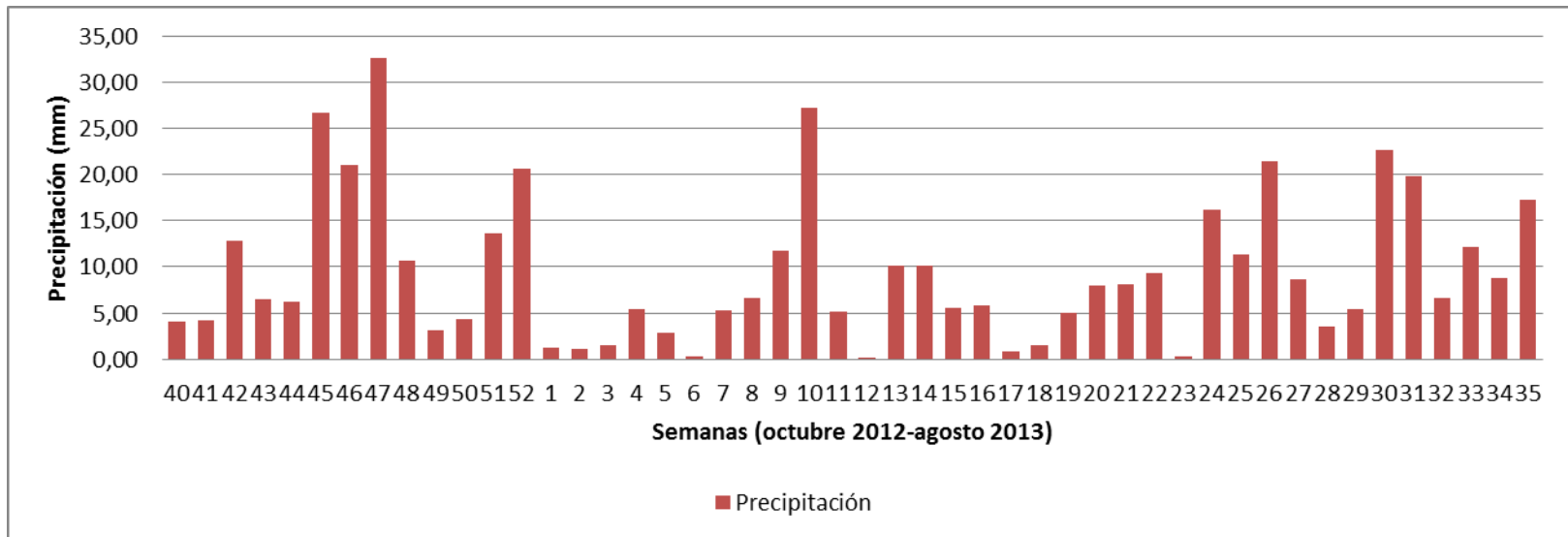
- Romero, R. 2003. The spread, detection and impact of black leaf streak disease and other *Mycosphaerella* species in the 1990s, pp. 21-47. In: Jacome L; Lepoivre P; Marin D; Ortiz R; Romero R; Escalant JV (eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 Mayo 2002. INIBAP, Roma.
- Romero, R.A; y Sutton, T.B. 1997. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology* 87: 96-100.
- Romero, R; Sutton, T.B. 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black Sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Dis.* 82: 931-934.
- 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.
- Rotem, J; Wooding, B; Aylor; D. 1985. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal; spores. *Phytopathology* 75:510-514.
- Ruiz-Silvera, C. 1995. Efecto de sustratos sobre bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en banano. Mag. Sci. Tesis, CATIE; Turrialba, Costa Rica.
- Samaniego, J; Cueto, C; Pedroza, A. 2008a. Efecto fungistático y fungicida del ácido acético y aceite esencial de orégano sobre esclerocios de *Phymatotrichopsis omnívora*. In vitro. Memorias de la XX semana internacional de Agronomía. Durango, México. p 193-195.
- Samaniego, J; Pedroza, A; Cueto, C. 2008b. Sobrevivencia de los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnívora* en soluciones de ácido acético, sulfúrico y

- amortiguadores. Memorias de la XX semana internacional de Agronomía. Durango, México. p 185-189.
- Sánchez, O; Pizarro, K; Restrepo, E. 2012. Estadísticas de exportación bananera 2011. Corporación Bananera Nacional (CORBANA). San José, Costa Rica. 82 p.
- Sandoval, J; Müller; L. 1999. Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa* AAA). Corbana 24:43-60.
- Setlow, R. 1974. The wavelength in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. Proceedings of the National Academy of Science 71:3363-3366.
- Soto, M. 1992. Banano, cultivo y comercialización. 2 ed. San José, CR. 625p.
- Spotts, R; Cervantes, L; Niederholzer, A. 1997. Effect of dolomitic lime on production of asci and pseudothecial ok *Venturia inaequalis* and *V.pirina*. Plant Dis. 81: 96-98.
- Stover, R 1972. Banana, plantain and abaca diseases. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey, UK. 216 p.
- Stover, R. 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantains. Plant Dis. 64:750-756
- Stover, R. 1983. The effect of temperature on ascospores germinative tube growth of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Fruits 38: 626-628.
- Stover, R.H. & Simmonds N.W. 1987. Bananas. Willey & Sons, New York.
- Stover, R; Dickson, J. 1976. Banana leaf spot caused bay *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* var. *difformis*: a comparison of the first central american epidemics. FAO Plant Prot. Bull. 24: 36-42.

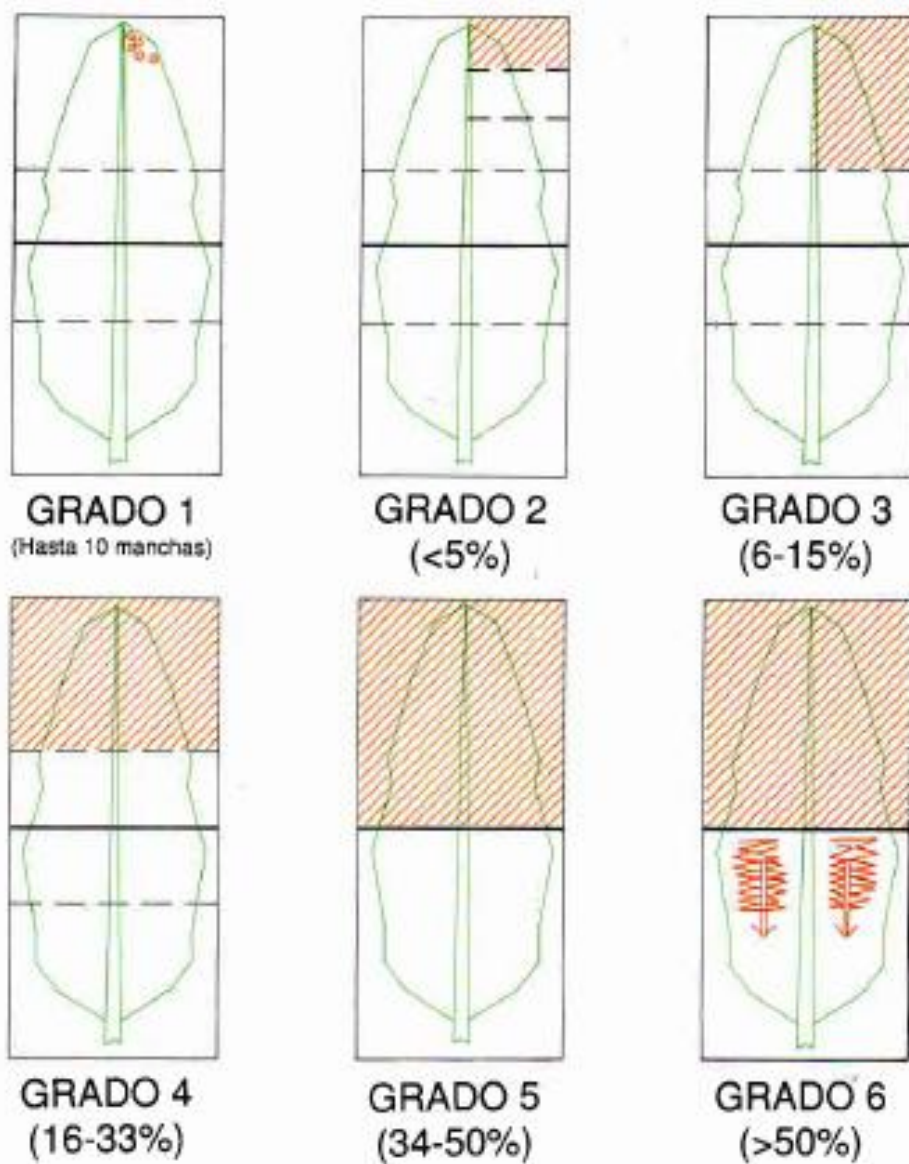
- Sutton, D; MacHardy, W; Lord, W. 2000. Effects of shredding or treating Apple leaf litter with urea on ascospore dose of *Venturia inaequalis* and disease buildup. Plant Dis. 84: 1319-1326.
- Thal, W; Sauter, H; Spurr, H; Arroyo, T. 1991. Relation between environmental factors and ascospore production *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka on banana.
- Uhre, G; Arneborg, N. 1998. Measurement of the effects of acetic acid and extracellular pH on intracellular pH of nonfermenting individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy. Applied and Environmental Microbiology 64: 530:534
- Vargas, A; Murillo, G; Guzmán, M; Araya, M; Blanco, F. 2008. Efecto de la defoliación a floración sobre el rendimiento del banano (Musa AAA, subgrupo Cavendish) y la severidad de la Sigatoka negra en condiciones semicomerciales. Revista CORBANA 34(61): 39-54.
- Villalta, R; Guzmán, M. 2005. Capacidad de esporulación de *Mycosphaerella fijiensis* en tejido foliar de banano depositado en el suelo y efecto antiesporuante de la urea. En: 1er Congreso Científico y Técnico Bananero Nacional. Pococí, Limón, Costa Rica. p 14.
- Webster, J; Weber, R; 2007. Introduction to fungi. 3 ed. Cambridge University. 841p.
- Zadocks, C; Schein, R. Epidemiology and plant disease management. New York, Oxford University Press, 1979. 427 p.

9. ANEXOS

Anexo 1. Promedio de precipitación semanal, registrado en la estación agroclimatológica La Rita, Corbana. Periodo Octubre 2012-agosto 2013.



Anexo 3. Escala de Stover modificada por Gauhl (1989). Para evaluación de *Sigatoka* negra. Fuente: Marín y Romero s.f.



Anexo 4. Estados de candela según Escala de Brun (1963). Fuente: Marín y Romero s.f.

