

**EFFECTO DE LA SENSIBILIDAD DE *Mycosphaerella fijiensis*
SOBRE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE FUNGICIDAS SISTÉMICOS
UTILIZADOS CONTRA LA SIGATOKA NEGRA**

JOHAN ENRIQUE MURILLO SALAS

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**

2015

**EFFECTO DE LA SENSIBILIDAD DE *Mycosphaerella fijiensis*
SOBRE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE FUNGICIDAS SISTÉMICOS
UTILIZADOS CONTRA LA SIGATOKA NEGRA**

JOHAN ENRIQUE MURILLO SALAS

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**

2015

**EFFECTO DE LA SENSIBILIDAD DE *Mycosphaerella fijiensis*
SOBRE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE FUNGICIDAS SISTÉMICOS
UTILIZADOS CONTRA LA SIGATOKA NEGRA**

JOHAN ENRIQUE MURILLO SALAS

Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:

Ing. Agr. Mauricio Guzmán Quesada, M.Sc.

Asesor Externo
CORBANA

Ing. Agr. Carlos Muñoz Ruiz, Ph.D.

Asesor Interno
TEC

Ing. Agr. Ricardo Villalta Bresciani, M.Sc.

Jurado
CORBANA

Ing. Agr. Joaquín Durán Mora, M.Sc.

Jurado
TEC

Ing. Agr. Carlos Ramírez Vargas, Ph.D.

Coordinador
Trabajos Finales de Graduación

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

Director
Escuela de Agronomía

2015

DEDICATORIA

A mis padres Alvaro Murillo Ramírez y Rita Salas Salas por creer siempre en mí, por su apoyo y amor incondicional brindado día a día.

A todas aquellas personas que nunca dejaron de creer en mí...

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso por permitirme alcanzar esta meta.

A la Dirección de Investigaciones de CORBANA S.A. por permitir la realización de esta tesis y las facilidades brindadas en el desarrollo de toda la investigación.

A mi asesor principal, el Ing. Mauricio Guzmán Quesada que es un investigador ejemplar, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por sus excelentes consejos que me sirvieron para este trabajo y para toda mi vida, por estar dispuesto a escucharme y guiarme en la realización de este proyecto, fungiendo como mi principal soporte a lo largo de toda la investigación.

A todo el personal del Laboratorio de Fitopatología de CORBANA S.A., porque siempre estuvieron dispuestos a colaborar, por brindarme su amistad y buenos consejos, especialmente a la Ing. Claudiana Carr, Sergio Duran, Donny Vargas y Carlos Quesada. Al Ing. Ricardo Villalta Bresciani por su amplia colaboración y disposición a escucharme en cualquier momento.

Al señor Fabio Blanco por su colaboración y consejos en el desarrollo de los análisis estadísticos y al señor Jose Antonio Guzmán por la ayuda brindada.

A todos los amigos y profesores con los que compartí buenos y malos momentos en mi paso por el TEC, especialmente a Javier Rojas, Fernan Paniagua, Gustavo Pereira, Carlos Cedeño, Oscar Castro, Marilyn Sánchez; Karla Chacón, Alfredo Zamora, Jacobo Solís, compañeros de generación y de muchas historias juntos.

A los profesores Carlos Muñoz y Joaquín Durán por las revisiones realizadas al informe final.

A todos los demás amigos y familiares que siempre me apoyaron.

A Mariela Pizarro por apoyarme siempre y por su comprensión en momentos difíciles.

A todos muchas gracias...

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación	2
1.2. Objetivo General.....	4
1.3. Objetivos Específicos.....	4
1.4. Hipótesis de investigación	4
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.2. Generalidades del cultivo de banano.....	5
2.2.1. Importancia del cultivo del banano en Costa Rica y el mundo	5
2.2.2. Subgrupo Cavendish	7
2.3. Sigatoka negra.....	7
2.3.1. Distribución de la Sigatoka negra	9

2.3.2	Ciclo de vida de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	9
2.3.3	Desarrollo de los Síntomas	11
2.3.4	Epidemiología.....	14
2.3.4.1	Periodo de incubación	16
2.3.4.2	Periodo de latencia	17
2.4	Diversidad genética de <i>M. fijiensis</i>	17
2.5	Combate de la Sigatoka negra	19
2.5.1	Combate cultural	20
2.5.2	Combate Biológico	22
2.5.3	Combate químico	23
2.5.3.1	Fungicidas protectores.....	24
2.5.3.2	Fungicidas sistémicos.....	24
2.6	Principales grupos de fungicidas utilizados en el control de Sigatoka negra	28
2.6.1	Benzimidazoles	28
2.6.2	Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE)	29
2.6.2.1	Inhibidores de la desmetilación (IDM).....	29
2.5.2.2	Morfolina	30
2.5.2.3	Spiroketalaminas	30
2.5.3	Inhibidores del transporte de electrones en el sitio Qol	31

2.5.4.	Anilinopyrimidinas.....	31
2.6.	Resistencia a fungidas.....	32
2.6.1.	Tipos de resistencia.....	34
2.6.1.1.	Resistencia de un solo paso o disruptiva.....	34
2.6.1.2.	Resistencia paso a paso o progresiva	34
2.6.1.3.	Resistencia cruzada.....	35
2.6.1.4.	Resistencia múltiple	35
2.6.2.	Mecanismos de resistencia	35
6.2.3	Estrategias para el manejo de resistencia a fungidas en el cultivo de banano	36
6.2.4	Monitoreo de resistencia de <i>M. fijiensis</i> a fungidas sistémicos	37
6.2.4.1	Benzimidazoles.....	38
6.2.4.2	Inhibidores de la biosíntesis de esteroides	38
6.2.4.3	Estrobilurinas	39
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1.	Ubicación de los experimentos y periodo de estudio.....	40
3.1.1	Finca La Esmeralda del TEC sede en Santa Clara (SC).....	40
3.1.2.	Finca experimental La Rita de CORBANA (LR)	40
3.1.3.	Finca Comercial Palacios de DOLE (PAL)	41
3.2.	Fungidas a evaluar.....	41

3.3.	Material experimental.....	42
3.4.	Manejo agronómico	43
3.5.	Descripción de la investigación.....	44
3.6.	Etapa I. Evaluación de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>M. fijiensis</i> a diferentes fungicidas sistémicos.....	44
3.6.1.	Descarga de ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	45
3.6.2.	Variables de evaluación	46
3.6.3.	Análisis de los datos.....	48
3.7.	Etapa II. Aplicación y evaluación de los tratamientos de fungicidas a nivel de campo.....	48
3.7.1.	Pruebas preliminares para la determinación del volumen y calibración del equipo de aplicación.....	49
3.7.2.	Aplicación de los tratamientos.....	50
3.7.3.	Variables de evaluación de los tratamientos.....	53
3.8.	Diseño estadístico y arreglo de los tratamientos	55
3.8.1.	Modelo estadístico.....	56
3.8.2.	Descripción de los tratamientos.....	56
3.9.	Análisis estadístico	57
4.	RESULTADOS	59
4.1.	Etapa I. Evaluación de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>M. fijiensis</i> a diferentes fungicidas sistémicos.....	59

4.2. Etapa II. Aplicación y evaluación de los tratamientos de fungicidas a nivel de campo.....	67
4.2.1. Determinación del volumen de mezcla aplicado en los tratamientos de fungicidas en el campo.	67
4.2.2. Resultados obtenidos en las pruebas de aplicaciones de los fungicidas en el campo	68
4.2.2.1. Periodos de Incubación (PI).....	68
4.2.2.1.1. PI Santa Clara	68
4.2.2.1.2. PI La Rita.....	70
4.2.2.1.3. PI Palacios.....	71
4.2.2.2. Periodos en presentar el estadio 4 de los síntomas de la enfermedad (PE4)	75
4.2.2.2.1. PE4 Santa Clara.....	75
4.2.2.2.2. PE4 La Rita	76
4.2.2.2.3. PE4 Palacios	77
4.2.2.3. Periodos de Latencia (PL)	78
4.2.2.3.1. PL Santa Clara	78
4.2.2.3.2. PL La Rita.....	79
4.2.2.3.3. PL Palacios.....	79
4.2.2.4. Evolución de la Severidad (% de necrosis) en el área aplicada con los diferentes fungicidas sistémicos.	84
4.2.2.4.1. Severidad Santa Clara.....	84

4.2.2.4.2. Severidad La Rita	86
4.2.2.4.3. Severidad Palacios	91
4.2.2.5. Evaluación de la eficacia de los fungicidas utilizados en el experimento.....	97
4.2.2.5.1. Eficacia (%) de los fungicidas sistémicos aplicados en Santa Clara	97
4.2.2.5.2. Eficacia (%) de los fungicidas sistémicos aplicados en La Rita	102
4.2.2.5.3. Eficacia (%) de los fungicidas aplicados en Palacios	103
5. DISCUSIÓN	108
6. CONCLUSIONES.....	131
7. RECOMENDACIONES	132
8. BIBLIOGRAFÍA.....	134
9. ANEXOS	148

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.	Ciclo de vida de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .	11
2.	Etapas de desarrollo de los síntomas de <i>M. fijiensis</i> . (A) Aparición de pequeñas pizcas, estadio 1. (B) Primer estadio de raya. (C) Segundo estadio de raya. (D) Primer estadio de mancha. (E) Segundo estadio de mancha, se notan levemente hundidas y rodeadas por un halo amarillo. (F) Último estadio de síntomas, tercer estadio de mancha, nótese como el centro de la mancha se vuelve grisáceo. Además, en la parte inferior se muestran los periodos evaluados en este experimento según el desarrollo de los síntomas (Murillo, 2015).	13
3.	Clasificación de las ascosporas de <i>M. fijiensis</i> según el efecto causado por los diferentes fungicidas. (A) Germinación normal, (B) No germinadas, (C) Tubos cortos, (D) Tubos distorsionados. CORBANA, 2015.	47
4.	(A) Mini torre de aspersión, modificada por CORBANA, según el modelo de Calpouzos (1962). (B) Aerógrafo Titan [®] , modelo BD-132A, utilizado en las pruebas de determinación del volumen de aplicación y en la aplicación de tratamientos en las parcelas experimentales (Santa Clara, La Rita y Palacios). Murillo, 2015.	50
5.	Forma de aplicación de los tratamientos en el campo. En la figura se puede notar la conexión del aerógrafo al cilindro de aire comprimido que permitió la aspersión del fungicida, además de la colocación de la mini torre de aspersión sobre el área previamente	

- marcada y el soporte colocado debajo de la hoja para evitar cualquier daño mecánico en la misma. Murillo, 2015. 52
6. Cuadrícula utilizada para la evaluación de la severidad (% de necrosis) en el área aplicada con los diferentes tratamientos incluidos en el experimento. Murillo, 2015. 54
7. Porcentajes de inhibición del tubo germinativo de las ascosporas de tres poblaciones de *M. fijiensis* descargadas en medios con agar-agua al 2% y a diferentes concentraciones de los fungicidas, luego de ser incubadas por 48 horas a 26-27 °C. Murillo, 2015. 63
8. Pruebas preliminares para la determinación del volumen a aplicar en la fase de campo. (A) Aplicación de 0,2 ml/80 cm², volumen total de 250 L ha⁻¹. (B) Aplicación de 0,28 ml/80 cm², volumen total de 350 L ha⁻¹. Murillo, 2015. 68
9. Periodos de incubación observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en 8, 12 y 16 DPI, en cada una de las parcelas experimentales. Nótese los PI más cortos en la población silvestre (SC). CORBANA, 2015. 81
10. Periodos en alcanzar el estadio 4 de los síntomas de la Sigatoka negra, observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en 8, 12 y 16 DPI, en cada una de las parcelas experimentales. Nótese los PE4 más extensos en la población menos sensible (PAL). CORBANA, 2015. 82
11. Periodos de latencia observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en 8, 12 y 16 DPI, en cada una de las parcelas experimentales. Nótese la diferencia poco marcada entre la población silvestre (SC) y la menos sensible (PAL) para esta variable. CORBANA, 2015. 83

12. Evolución de la severidad en el área tratada con los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 8 DPI, en cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015. 94
13. Evolución de la severidad en el área tratada con los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 12 DPI, en cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015. 95
14. Evolución de la severidad en el área tratada con los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 16 DPI, en cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015. 96
15. Comportamiento de la eficacia de los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 8 DPI, para cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015. 105
16. Comportamiento de la eficacia de los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 12 DPI, para cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015. 106
17. Comportamiento de la eficacia de los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 16 DPI, para cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015. 107

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1.	Recomendaciones del uso de fungicidas sistémicos en el combate de la Sigatoka negra del banano (Tomado y modificado de FRAC 2014a)	26
2.	Principales grupos de fungicidas utilizados en el combate de la Sigatoka negra y su riesgo en el desarrollo de resistencia por parte del patógeno. (Tomado y modificado de FRAC 2014b)	27
3.	Fungicidas sistémicos empleados en los tratamientos del experimento.	42
4.	Manejo de la fertilización de la plantación según el programa recomendado por la Sección de Suelos y Drenajes de CORBANA	43
5.	Tratamientos aplicados en el experimento en cada una de las parcelas experimentales (Santa Clara, La Rita y Palacios). CORBANA, 2014.	56
6.	Porcentajes de inhibición del crecimiento del tubo germinativo de las ascosporas de <i>M. fijiensis</i> , obtenidos de la evaluación <i>in vitro</i> de diferentes fungicidas sistémicos en tres poblaciones del patógeno: Santa Clara, La Rita y Palacios.	65
7.	Valores de Concentración efectiva media (CE ₅₀) obtenidos para cada fungicida utilizado en las tres poblaciones estudiadas.	66
8.	Periodos de incubación (PI), Periodos en alcanzar el estadio 4 de síntomas (PE4) y Periodos de latencia (PL) observados en	

- los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en la parcela experimental de Santa Clara. CORBANA, 2015. 72
9. Pruebas de contrastes realizados entre los diferentes tratamientos aplicados en la parcela experimental de Santa Clara, para las variables PI, PE4 y PL. CORBANA, 2015. 72
10. Periodos de incubación (PI), Periodos en alcanzar el estadio 4 de síntomas (PE4) y Periodos de latencia (PL) observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en los diferentes DPI en la parcela experimental de La Rita. CORBANA, 2015. 73
11. Pruebas de contrastes realizados entre los diferentes tratamientos aplicados en la parcela experimental de La Rita para variables PI, PE4 y PL. CORBANA, 2015. 73
12. Periodos de incubación (PI), Periodos en alcanzar el estadio 4 de síntomas (PE4) y Periodos de latencia (PL) observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en los diferentes DPI en la parcela experimental de finca Palacios. CORBANA, 2015. 74
13. Pruebas de contrastes realizados entre los diferentes tratamientos aplicados en la parcela experimental de Finca Palacios, para las variables PI, PE4 y PL. CORBANA, 2014. 74
14. Porcentajes de severidad o necrosis, en el área de aplicación de los tratamientos de fungicidas, para los diferentes DPI, en las evaluaciones realizadas a lo largo del experimento en la parcela experimental de Santa Clara. CORBANA, 2015. 87
15. Porcentajes de severidad o necrosis, en el área de aplicación de los tratamientos de fungicidas, para los diferentes DPI, en las

evaluaciones realizadas a lo largo del experimento en la parcela experimental de La Rita. CORBANA, 2015.	90
16. Porcentajes de severidad o necrosis, en el área de aplicación de los tratamientos de fungicidas para los diferentes DPI, en las evaluaciones realizadas a lo largo del experimento en la parcela experimental finca Palacios. CORBANA, 2015.	93
17. Porcentajes de eficacia obtenidos en cada uno de los tratamientos aplicados en la parcela experimental de Santa Clara, obtenidos en base a las evaluaciones de la severidad de cada tratamiento en los diferentes DPI. CORBANA, 2015.	99
18. Porcentajes de eficacia obtenidos en cada uno de los tratamientos aplicados en la parcela experimental de La Rita, obtenidos en base a las evaluaciones de la severidad de cada tratamiento en los diferentes DPI. CORBANA, 2015.	100
19. Porcentajes de eficacia obtenidos en cada uno de los tratamientos aplicados en la parcela experimental de Palacios, obtenidos en base a las evaluaciones de la severidad de cada tratamiento en los diferentes DPI. CORBANA, 2015.	101

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Título	Página
1.	Escala de Stover modificada por Gauhl (1989).	148
2.	Estados de apertura de la hoja candela según la Escala de Brun (1963). Murillo 2015. Santa Clara, San Carlos.	149
3.	Resumen de los datos climáticos, obtenidos de las estaciones metereológicas más cercanas a cada una de las parcelas experimentales. Estación Santa Clara, TEC para la parcela experimental de Santa Clara, Estación La Rita, CORBANA para la parcela experimental de La Rita y Estación Valquiria para la parcela experimental de Palacios. 2014.	149
4.	Dosis de fungicida, aceite, agua y emulsificante utilizados en la preparación de 150 ml de emulsión de cada tratamiento, para las aplicaciones en campo.	151
5.	Mapas del índice de infección de cada una de las parcelas experimentales.	152

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de determinar la pérdida de sensibilidad *in vitro* de 11 fungicidas sistémicos utilizados en el combate de la Sigatoka negra y su impacto en la eficacia biológica a nivel de campo. La investigación fue llevada a cabo en tres localidades, con poblaciones de *M. fijiensis* con diferente nivel de sensibilidad a los fungicidas, Santa Clara (silvestre), La Rita (ligeramente resistente) y Palacios (resistente). La investigación fue planteada en dos etapas. En la primera se realizaron análisis de sensibilidad *in vitro* de las tres poblaciones, mediante la descarga de ascosporas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de los fungicidas (0,001-0,01-0,1-1,0-10 mg L⁻¹). Se determinó la pérdida de sensibilidad al propiconazole, difenconazole, tridemorph, fenpropimorph, spiroxamina, pyraclostrobin, boscalid, metil tiofanato y dietofencarb en las poblaciones de La Rita y Palacios, mientras que al epoxiconazole se mostró pérdida de sensibilidad solamente en La Rita y al pirymetanil únicamente en Palacios, con respecto a los porcentajes de inhibición en las dosis discriminantes de 0,01 y 0,1 mg L⁻¹ y las CE₅₀. En la segunda etapa, se realizaron aplicaciones de los fungicidas a nivel de campo en 8, 12 y 16 DPI (días post infección), sobre un área de 80 cm² marcada previamente en la porción izquierda de la hoja (25% distal de la hoja, vista por el haz), utilizando una mini torre de aspersión modificada por CORBANA según el modelo de Calpouzos (1962) y un aerógrafo (Titan[®], modelo BD-132A), en un diseño Completamente al azar con arreglo factorial 12x3 (11 fungicidas y aplicación de aceite mineral) con 5 repeticiones por tratamiento y 5 plantas como testigo para un total de 185 unidades experimentales. Se evaluaron el periodo de incubación (PI), periodo en alcanzar el primer estadio de mancha (PE4), periodo de latencia (PL), evolución de la severidad y eficacia de los fungicidas. Todos los PI fueron más cortos en la población silvestre (SC), todos los PE4 fueron más extensos en la población resistente y los PL fueron muy similares en la población silvestre y la resistente. La evolución de la severidad fue muy acelerada en la población silvestre y en la ligeramente resistente y muy leve en la resistente, que tardó 24 días más en

alcanzar el 100% de necrosis en el área de evaluación de los testigos, lo que evidencia una pérdida de aptitud parasítica en esa población. Además, se observó un detrimento en la eficacia de los fungicidas en las poblaciones ligeramente resistente (LR) y resistente (PAL), debido a la pérdida de sensibilidad a los mismos. Estos resultados son evidencia de un grave problema de resistencia en las poblaciones de *M. fijiensis* que prevalecen y se acrecientan en la zona bananera del Caribe de Costa Rica, a la mayoría de fungicidas sistémicos empleados en el combate de la Sigatoka negra.

Palabras clave: banano, sensibilidad *in vitro*, resistencia a fungicidas, combate químico, eficacia biológica de los fungicidas, manejo de resistencia a fungicidas.

ABSTRACT

A two-phase study was carried out to first assess the degree of *in vitro* loss of sensitivity of 11 systemic fungicides used to combat Black Sigatoka, a second phase followed to assess how this diminished effectiveness affected their ability to control the disease in the field. The study was carried out at three different sites with varying levels of strand-sensitivity to fungicides, Santa Clara (a wild strand), La Rita (a moderate resistance strand), and finally Palacios (a resistant strand); and two stages. First, the *in vitro* sensitivity of the three populations was analyzed by treating ascospores grown on culture media with different concentrations of fungicide (0.001-0.01-0.1-1.0-10 mg L⁻¹). A loss of sensitivity was observed to propiconazole, difenconazole, tridemorph, fenpropimorph, spiroxamine, pyraclostrobin, boscalid, thiphanate-methyl and diethofencarb in La Rita and Palacios, a loss of sensitivity to epoxiconazole in La Rita only, and to pirymethanil in Palacios only, with respect to inhibition percentages in distinct doses of 0,01 y 0,1 mg L⁻¹ and CE₅₀. In the second stage of the study, field applications of the fungicides were conducted at 8, 12 and 16 DPI (days post infection) over a previously measured 80cm² area on the left side of a leaf (25% of the distal portion of the blade, viewed from above). We used a mini sprayer modified for CORBANA according to Calpouzos (1962) and an airbrush (Titan[®], modelo BD-132^a), in a random design experiment with a 12x3 factorial arrangement (11 fungicides and mineral oil application), to apply 5 treatment repetitions on 5 test plants for a total of 185 experimental units. The incubation period (PI), amount of time to reach the first stage of infection (PE4), the latency period (PL), the progression of infection severity and the efficacy of the fungicides were evaluated. PI was shorter in the wild strand in all cases, PE4 was longest in the resistant strand, and PL was similar between the wild and resistant strands. The progression of infection severity was very accelerated in the wild and moderately resistant strands, and very slight in the resistant population, which took 24 days longer to reach 100% necrosis in the experimental area on the test plants. This shows a loss of parasitic fitness in that population. In addition, we observed a decrease in the efficacy of the fungicides in the moderately resistant (LR) and resistant population strands (PAL), due to the

loss of effectiveness. These results are evidence of a serious resistance problem to the main systemic fungicides in populations of *M. fijiensis* that is both prevailing and increasing in the banana growing zone of the Caribbean region of Costa Rica.

Key words: bananas, sensitivity *in vitro*, resistance, fungicide resistance, chemical control, biological efficacy of fungicidal, fungicide resistance management.

1. INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) es la enfermedad de mayor importancia en el cultivo del banano (Guzmán 2002; Romero 1997; Scot 2008; FRAC 2012; Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013) y una de las principales enfermedades de los cultivos en el mundo (Ganry *et al.* 2012). Esta enfermedad, aunque no causa la muerte de la planta, provoca un gran deterioro en el área foliar y reduce la fotosíntesis (Rodríguez y Cayón 2008; Churchill 2011; Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013). En ausencia de un combate adecuado, es capaz de provocar entre un 40 a 50% de reducción en el peso del racimo e inclusive un 100% de pérdidas en la producción por afectación de la calidad de la fruta, debido principalmente a problemas de maduración prematura en el campo o durante el transporte a los mercados de destino (Stover 1980; Romero 1997; Guzmán 2002 y 2006; Ortiz *et al.* 2010; Martínez *et al.* 2011; Guzmán *et al.* 2013).

En Costa Rica y otros países, el combate de esta enfermedad se ha basado en la implementación de un manejo integrado del patógeno, que incluye prácticas culturales, medidas fitosanitarias y principalmente la aplicación periódica de fungicidas (Guzmán 2002; Pérez 2006). Sin embargo, *M. fijiensis* ha sido capaz de crear resistencia a varios grupos de fungicidas sistémicos, debido a la fuerte presión de selección ejercida sobre las poblaciones del patógeno, con el uso frecuente de los mismos (Dekker 1982; Schwinn 1982b; Romero y Sutton 1997 y 1998; Guzmán 2002 y 2006; Scot 2008; Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013). A lo anterior se suma la alta capacidad de recombinación genética de *M. fijiensis*, dada su eficiente reproducción sexual y su carácter heterotálico, dando como resultado una gran diversidad genética y variantes en la población del hongo (Pérez *et al.* 2004; Guzmán 2006).

Según Dekker (1982a) y Brent y Hollomon (2007) con la introducción de los fungicidas sistémicos, alrededor de la década de los 70's, se dio la aparición de los primeros casos de resistencia a los mismos y el tiempo en surgir fue relativamente

corto, en algunos casos el desarrollo de resistencia se dio en los primeros dos años de uso comercial. *M. fijiensis* desarrolló resistencia primero a los benzimidazoles, luego a los triazoles y estrobilurinas (Romero y Sutton 1997 y 1998; Guzmán 2002; Marín *et al.* 2003; Brent y Hollomon 2007; Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013) y recientemente se ha detectado una evidente pérdida de sensibilidad a las aminas (Guzmán 2002; Marín *et al.* 2003) y carboxamidas, lo cual ha reducido su eficacia a nivel de campo y un uso más restringido de los mismos (Guzmán *et al.* 2013).

Aunado a esto, se ha puesto en evidencia que poblaciones del patógeno resistentes a benomil, siguieron mostrando una alta frecuencia de individuos resistentes, incluso después de varios años de las últimas aplicaciones de dicho fungicida en el campo (Romero y Sutton 1998; Marín *et al.* 2003; Pérez 2006). Además, Guzmán (2007) evaluó un periodo libre de fungicidas triazoles en una población con alta frecuencia de aislamientos resistentes a estos y observó que los aislamientos resistentes persistían en una alta frecuencia dentro de la población, aún después de haber retirado los fungicidas triazoles por 5 años. El autor corroboró con este estudio, la buena aptitud parasítica “fitness” de los aislamientos resistentes a triazoles y la dificultad de recuperar la sensibilidad a los mismos en las poblaciones del patógeno.

1.1. Justificación

La repentina aparición de poblaciones de patógenos resistentes a fungicidas, puede provocar la pérdida del control de la enfermedad y como consecuencia grandes pérdidas en la producción (Dekker 1982; Lucas *et al.* 2015). En banano los primeros casos de resistencia a benzimidazoles fueron descritos en Honduras en la década de 1970 (Stover 1980) y años más tarde se observó la aparición de resistencia a otros grupos químicos de fungicidas.

Martínez *et al.* (2012) señalan que este desarrollo de resistencia en *M. fijiensis* es un factor crítico y al que se debe prestar mucha atención en la producción bananera. Este fenómeno reduce la efectividad de los programas de manejo de la

Sigatoka negra, los cuales en los últimos años se han intensificado y han conllevado a un incremento de aplicaciones de fungicidas, mejoramiento de las técnicas de aplicación y un intenso combate cultural. Por esta razón, Schwinn (1982a), Brent y Hollomon (2007) y Ganry *et al.* (2012) afirman que es de vital importancia realizar monitoreos en los patógenos, que permitan determinar su sensibilidad a los fungicidas utilizados comúnmente en los programas de manejo, ya que permitiría identificar oportunamente cambios en la sensibilidad del patógeno y reducir el riesgo de desarrollo de resistencia en las poblaciones de patógenos. Lo anterior por cuanto, la pérdida de sensibilidad o el desarrollo de resistencia a los fungicidas, afecta notablemente su eficacia biológica en el combate de enfermedades comprometiendo la sanidad y por ende la producción de los cultivos.

En Costa Rica el desarrollo de resistencia de *M. fijiensis* a los principales grupos de fungicidas sistémicos, ha obligado a reducir los intervalos de aplicación y a la utilización de mezclas con mancozeb (“cocktails”) para mantener bajo control la enfermedad (Romero y Sutton 1997). Sin embargo, se carece de estudios recientes y detallados que cuantifiquen el impacto de la resistencia sobre la actividad curativa de los fungicidas sistémicos a nivel de campo, aspecto crucial para definir las ventajas de incluir o no un determinado fungicida en los programas de combate de la enfermedad y para reducir el riesgo de pérdida de control en las plantaciones (Guzmán 2014)¹.

Esta investigación brinda información del impacto que ha tenido el desarrollo de resistencia en la eficacia biológica y actividad curativa de los fungicidas sobre la Sigatoka negra. Lo anterior mediante la evaluación en campo de la eficacia de los fungicidas, ante tres poblaciones del patógeno con diferente nivel de sensibilidad e historial de aplicaciones de fungicidas.

¹Guzmán, M. 2014. Resistencia a fungicidas a nivel de campo. Comunicación Personal. CORBANA S.A. Correo electrónico: mguzman@corbana.co.cr

1.2 Objetivo General

- Determinar el efecto de la pérdida de sensibilidad *in vitro* de *M. fijiensis* a fungicidas sistémicos en su eficacia biológica a nivel de campo para el combate de la Sigatoka negra en banano.

1.3 Objetivos Específicos

- Caracterizar en términos de sensibilidad *in vitro* a fungicidas, las tres poblaciones de *M. fijiensis* que serán estudiadas.
- Evaluar el efecto curativo en campo de 11 fungicidas sistémicos con diferentes mecanismos de acción, sobre las tres poblaciones de *M. fijiensis* con diferente nivel de sensibilidad *in vitro* a estos compuestos.
- Establecer la relación entre la sensibilidad *in vitro* y la actividad curativa en campo de los fungicidas sistémicos utilizados en el combate de la Sigatoka negra.

1.4 Hipótesis de investigación

Las tres poblaciones de *M. fijiensis* seleccionadas mostrarán diferencias de sensibilidad *in vitro* a los fungicidas sistémicos según sea su historial de aplicaciones y esa condición afectará la eficacia biológica en campo de los fungicidas en el combate de la Sigatoka negra.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.2 Generalidades del cultivo de banano

Según Scot (2008) el banano es una planta perteneciente a la familia de las musáceas, nativo de la India, Malasia y de los trópicos asiáticos y australianos. Las especies de este género son agrupadas según su ploidía, que se refiere al número de pares de cromosomas que contienen y la proporción de juegos de cromosomas de *Musa acuminata* (A) y *Musa balbisiana* (B) presente en su genoma. Según Soto (1985) y Manzo *et al.* (2005) es una planta herbácea, poliploide y de ciclo perenne, la cual se ha logrado adaptar y desarrollar tanto en regiones tropicales como subtropicales. La planta de banano está formada por tres partes principales: el cormo con los brotes laterales o hijos, el pseudotallo formado por las vainas foliares de las hojas que presenta una filotaxia en espiral y la inflorescencia que sale a través del centro del pseudotallo hasta la superficie.

Los bananos presentan gran susceptibilidad a diversos patógenos capaces de causar fuertes enfermedades en diferentes órganos de la planta, presentando grandes problemas en la producción de la fruta para exportación. Algunas de las enfermedades matan la planta como en el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) y *Ralstonia solanacearum* (Moko); también se ven afectados por virus como el Brunchy top (BBTV), pero sin embargo, las enfermedades foliares como *Mycosphaerella fijiensis*, aunque no es capaz de causar la muerte de la planta, logra alcanzar altos niveles de incidencia y un fuerte impacto en la producción y calidad de las frutas, esto le da un lugar sobresaliente en importancia de las enfermedades que afectan los bananos y plátanos en el mundo (Marín *et al.* 2003; Guzmán 2006).

2.2.1 Importancia del cultivo del banano en Costa Rica y el mundo

Según Marín *et al.* (2003) el cultivo de las musáceas tiene gran importancia en todo el mundo, siendo una de las principales actividades de producción agrícola y

ocupa el primer lugar en el cultivo de frutas (Ganry *et al.* 2012). En la actualidad se cultiva banano y plátano en más de 100 países en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Marín *et al.* 2003; Pérez, 2012). Dentro de los países más productores se pueden mencionar la India, Uganda, Ecuador, Brasil y Colombia, quienes producen el 44 % del total (Marín *et al.* 2003). El área ocupada por el cultivo del banano en todo el mundo, sobrepasa los 10 millones de hectáreas y la producción que se alcanza es de más de 117 millones de toneladas métricas, de las cuales solamente 14 millones forman parte del comercio internacional (Ganry *et al.* 2012). Según Manzo *et al.* (2005) y Ganry *et al.* (2012) los países de América Latina son los principales exportadores de la fruta fresca (80%) a mercados estadounidenses y europeos. Dichos mercados se vieron beneficiados con la introducción de tecnologías de refrigeración y la utilización de variedades de banano utilizados como postre (Marín *et al.* 2003).

En Costa Rica el cultivo del banano sigue ocupando el primer lugar en las exportaciones, representando un 7,3% del total. Además se ubica a nivel mundial como el tercer mayor exportador de banano, debido principalmente a la alta productividad y calidad alcanzada. Para el 2013 el área cultivada con banano en Costa Rica fue de 49.849 ha, con lo cual, la industria bananera brinda gran cantidad de empleos de manera directa como indirecta, se estiman alrededor de 40.000 y 100.000 empleos respectivamente, logrando colocar las frutas de alta calidad en mercados muy exigentes como Inglaterra, Bélgica, Alemania, Estados Unidos entre otros (CORBANA 2013).

Para el año 2013, se registró la salida de 110 millones de cajas de banano para la exportación, con destino principalmente a la Unión Europea (48,3%) y Estados Unidos (40,7%), el 11% restante fue enviado a otros pequeños mercados como Turquía y Noruega. Costa Rica percibe ingresos por las exportaciones de banano que sobrepasan los 820 millones de dólares anuales, lo que favorece en gran medida la economía del país (CORBANA 2013).

2.2.2 Subgrupo Cavendish

Según Robinson y Galán (2011) este subgrupo se introdujo como cultivar comercial debido al problema que se generó por la infestación del mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) raza 1) que afecta a los bananos Gros Michael pero no a los de este tipo, lo que provocó un cambio de los materiales genéticos utilizados y actualmente son los más cultivados en las regiones productoras. Estos materiales mantienen gran importancia económica principalmente para los mercados de exportación en los trópicos y consumo local en los subtropicos. Los cultivares más utilizados de este subgrupo son el Valery, el Grande Naine (Marín *et al.* 2003; Robinson y Galán 2011) y en menor proporción el cultivar Williams (Marín *et al.* 2003).

Según Ganry *et al.* (2012) los cultivares pertenecientes a este grupo de bananos (*Musa acuminata*, AAA, subgrupo Cavendish), son altamente susceptibles a la Sigatoka negra, lo que está altamente relacionado a las fuertes infestaciones de esta enfermedad, documentadas en casi todas las zonas bananeras del mundo.

2.3 Sigatoka negra

Según Stover (1987) citado por Alvarado (2002) la Sigatoka negra es la enfermedad más destructiva que ataca el follaje del género *Musa*. Es originaria del Sureste Asiático (Stover 1980; Guzmán *et al.* 2013), descrita por primera vez en 1963 en la isla de Fiji, y observada en el sureste de Viti Levu, cerca del valle de Sigatoka, donde también fue detectada por primera vez la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*, Leach) (Guzmán *et al.* 2013). La enfermedad es causada por el hongo ascomyceto *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet en su estado sexual y *Pseudocercospora fijiensis*, Morelet en su estado asexual (Marín *et al.* 2003; Agrios 2005; Churchill 2011; Guzmán *et al.* 2013). Pertenece a la clase Dothideomycetes, orden Capnodiales, familia Mycosphaerellaceae (Churchill 2011), la cual ha afectado las plantaciones bananeras de Centroamérica por más de 40 años (Guzmán *et al.* 2013).

M. fijiensis se desarrolló por mucho tiempo coexistiendo con *M. musicola*, a la cual fue desplazando principalmente por factores climáticos en Asia y América Central. La Sigatoka amarilla se desarrolla en condiciones de baja temperatura, alrededor de los 17 °C, favorecida por altitudes superiores a 1.000 m.s.n.m, caso contrario al de la Sigatoka negra, que se desarrolla en las zonas más bajas donde la temperatura y humedad son altas, atacando con mucha severidad las plantaciones de banano y otras musáceas (Marín *et al.* 2003; Guzmán *et al.* 2013). Agrios (2005) menciona que ambos patógenos tienen una morfología y ciclos de vida muy similares, exceptuando que *M. fijiensis* produce esporodoquios en lugares pequeños, y sus hifas recorren la superficie foliar en busca de otros estomas por donde penetrar, causando afectaciones con mayor rapidez. Ambos patógenos pueden producir espermacios en espermagonias, ascosporas y conidios.

En estudios realizados por Rodríguez y Cayón (2008), pudieron determinar el impacto causado por *M. fijiensis* sobre los procesos fisiológicos de las plantas de banano. Estos autores comprobaron que las hojas afectadas por este patógeno, mostraron una pérdida marcada en la biomasa y en la concentración de clorofila desde que inician los primeros síntomas de la infección, interfiriendo sobre procesos esenciales como la fotosíntesis y la transpiración, además de afectar otros procesos como la actividad estomática y disminución en las concentraciones de almidón y azúcares en el tejido foliar. Todas estas afectaciones provocan daños irreparables en el tejido foliar, lo que impide el funcionamiento y desarrollo normal de la planta, provocando la disminución del rendimiento. Los efectos son mayores cuando la infección se encuentra del estadio 4 del desarrollo de síntomas en adelante, por lo que un combate temprano de la enfermedad disminuye en gran medida los problemas mencionados anteriormente.

2.3.1 Distribución de la Sigatoka negra

Según Stover (1980) el centro de origen y distribución de la Sigatoka negra se encontró en Asia y que de ahí el patógeno se propagó al resto del mundo. El primer lugar donde se encontró *M. fijiensis* fuera de su centro de origen, fue Honduras en el año 1972, apareció luego en Zambia en 1973 y en Gambia en 1979. En el caso de América Central este patógeno se fue diseminando lentamente, en Belize fue detectada en el año 1975 y en Guatemala en 1977, mientras que en Costa Rica la enfermedad apareció en octubre de 1979 en la Meseta Central y en Santa Clara, afectando alrededor de 4.000 ha de cultivo de plátano. En ese mismo año, la enfermedad se difundió por una zona bananera de Nicaragua y en 1980 ya se encontraba atacando las plantaciones de toda la zona Atlántica de Costa Rica, además dos años más tarde, ya se había difundido a las costas Atlántica y Pacífica de Panamá (Stover 1980). Según Guzmán *et al.* (2013) actualmente *M. fijiensis* se encuentra presente en casi toda América; a partir de 1980 ya se encontraba en México y en la península de Florida desde 1998, hacia el sur llegó hasta Bolivia en 1996, a Brasil en 1998 y a Guyana en el 2009. La enfermedad también se dispersó rápidamente por el Caribe, apareciendo en Cuba en 1990, Jamaica en 1995, República Dominicana en 1996 y en Puerto Rico en el 2004. De igual forma se encontró en Trinidad y Tobago en el año 2005, en San Vicente en el 2009, en las islas de Santa Lucía y Martinica en el 2010 y en Dominica y Guadalupe en el 2012.

2.3.2 Ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis*

Según Stover y Simmonds (1987) citados por Alvarado (2002) y Ganry *et al.* (2012), el ciclo de vida de *M. fijiensis* inicia con la germinación de las esporas que llegan al tejido foliar, y que posteriormente penetran por medio de los estomas, periodo que según Stover (1980) tarda de 48 – 72 horas, en presencia de alta humedad y temperatura que sobrepase los 20 °C. Stover (1980), Romero (1997) y Guzmán (2003), mencionan que la Sigatoka negra puede ser provocada por dos fuentes de inóculo, las ascosporas en su fase sexual o por conidios en su fase asexual y según Scot (2008) este inóculo es diseminado por varios mecanismos

que incluyen, la escorrentía, el salpique del agua de lluvia y el viento, Stover (1980) menciona que la dispersión aérea es la más importante, debido a que las ascosporas pueden ser transportadas a más de 50 Km de distancia.

Según Romero (1997) una vez que se da la germinación de las esporas, las hifas crecen y se ramifican colonizando así los espacios intercelulares, mostrando los primeros síntomas entre los 12 y 18 días, mientras que Marín *et al.* (2003) y Ganry *et al.* (2012) mencionan que este periodo puede tardar de 14 a 20 días. Romero (1997) indica que los primeros síntomas son únicamente puntos cloróticos en el envés de las hojas que se van haciendo más severos hasta desarrollar manchas necróticas de forma ovalada con el centro seco, en donde se producen pseudotecios con ascosporas, especialmente en las hojas con lesiones más viejas. Por su parte los conidios se desarrollan desde las primeras etapas de síntomas de raya en hojas jóvenes y de edad intermedia (estadios 2-4) (Romero 1997; Ganry *et al.* 2012), estos se forman sobre estructuras llamadas conidióforos, que pueden ser individuales o en grupos de dos o tres, que emergen de los estomas (Romero 1997). En la Figura 2 se puede observar el ciclo de vida de *M. fijiensis* con su fase sexual y asexual.

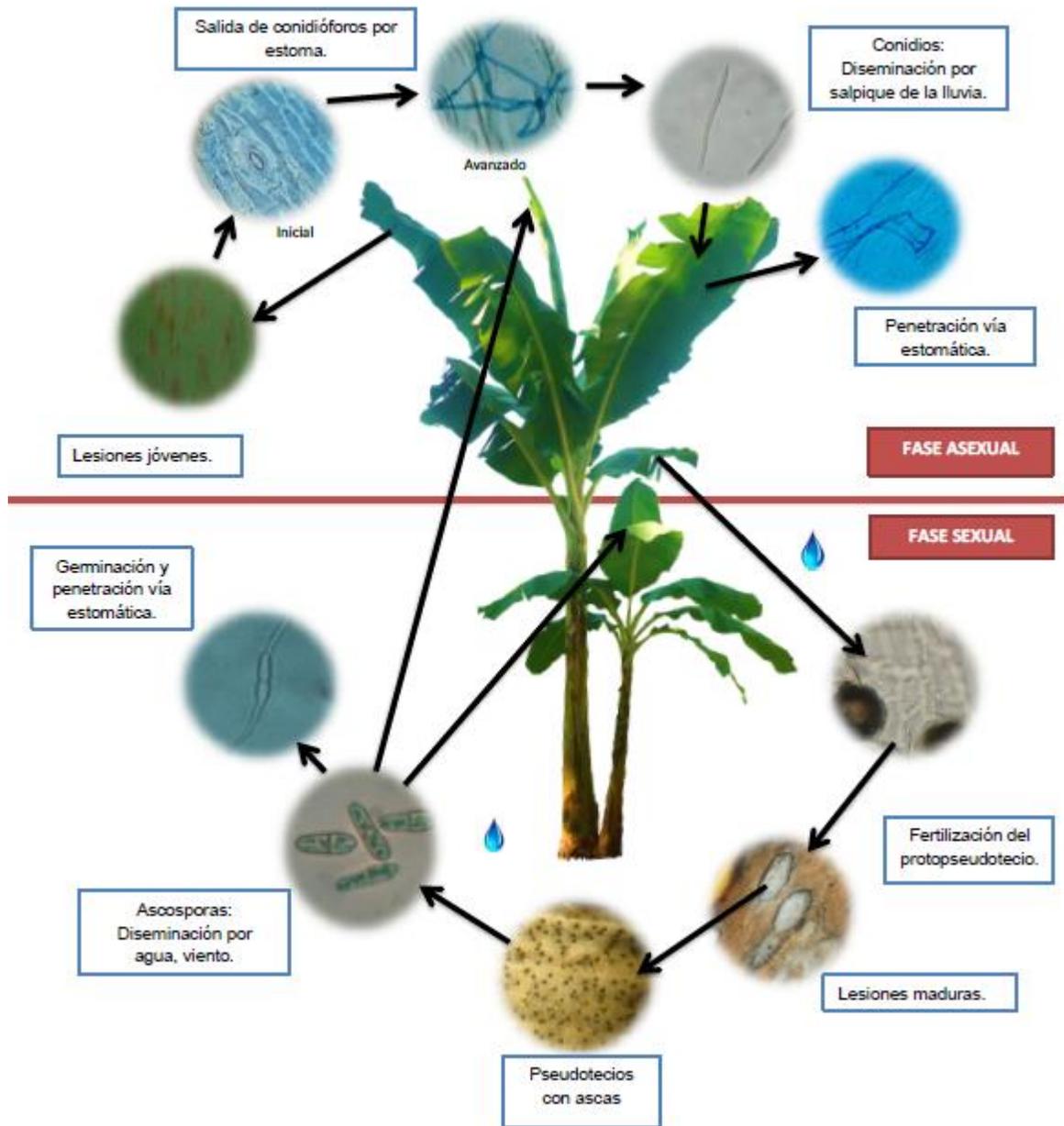


Figura 1. Ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis*.

Tomado de: Gómez, M. (2013)

2.3.3 Desarrollo de los Síntomas

Según Marín *et al.* (2003) y Manzo *et al.* (2005) el desarrollo de la enfermedad se ha descrito en seis estadios o etapas de desarrollo de síntomas y se clasifican

como: una etapa de puntos, dos etapas de raya y tres etapas de mancha (Figura 2).

Según Marín *et al.* (2003) en la primera etapa, los síntomas que se manifiestan en la hoja son puntos cloróticos que aparecen de 14 a 20 días después de que el patógeno ha infectado la planta, Manzo *et al.* (2005) mencionan que estos puntos miden 0,25 mm de diámetro y Ganry *et al.* (2012) mencionan que estos puntos apenas se ven a simple vista por el envés de la hoja.

En la segunda etapa, Marín *et al.* (2003) y Ganry *et al.* (2012) indican que los síntomas de la infección comprenden rayas rojizas o marrones que pueden ser observadas en ambas superficies de la hoja infectada. Según Ganry *et al.* (2012) estas rayas o estrías se tornan progresivamente marrón por el envés y negras por el haz, siendo la primera evidencia de síntomas en esta superficie y se manifiesta como rayas amarillas que van cambiando su coloración hacia marrón. Por otra parte Manzo *et al.* (2005) también mencionan que estas rayas pueden ser visibles en el haz y paralelas a las venas laterales, con dimensiones de 1 mm de ancho y 2 mm de largo.

En la tercera etapa de síntomas las rayas en la hoja se ensanchan y comienzan a cambiar de rojizas o marrón a un marrón oscuro (Marín *et al.* 2003; Ganry *et al.* 2012). El tamaño de las rayas en esta etapa llega a ser de 20 a 25 mm de largo y 2 mm de ancho y pueden verse en la superficie abaxial como rayas amarillas (Manzo *et al.* 2005).

En la cuarta etapa se produce un ensanchamiento de las rayas y se tornan completamente marrón oscuro, las cuales son rodeadas por un halo amarillo pálido (Manzo *et al.* 2005; Ganry *et al.* 2012). Según Marín *et al.* (2003) se observa el desarrollo de puntos cafés o marrones oscuros en el envés y puntos negros en el haz de las hojas y además según Ganry *et al.* (2012) en esta etapa se da la formación de conidios.

La quinta etapa se caracteriza por el desarrollo de un halo clorótico alrededor de los puntos o manchas negras, las cuales se pueden observar levemente hundidas y acuosas (Marín *et al.* 2003 y Manzo *et al.* 2005; Ganry *et al.* 2012) y para la sexta y última etapa de síntomas, los mismos autores mencionan que las manchas se convierten en una lesión con severa necrosis, se secan y se tornan de color grisáceo a blanquecino con puntos observables a simple vista que corresponden a las estructuras productoras de ascosporas, además se pueden notar muy hundidas de la superficie de la hoja. También las manchas son rodeadas por un borde bien marcado de coloración pardo oscuro o negro, entre este borde y zonas de color verde no afectadas se puede observar una zona de transición de coloración amarillo brillante (Manzo *et al.* 2005).

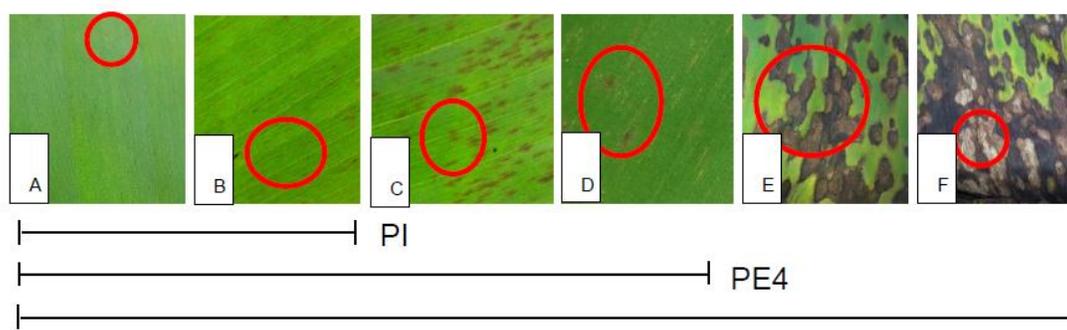


Figura 2. Etapas de desarrollo de los síntomas de *M. fijiensis*. **(A)** Aparición de pequeñas pizcas, estadio 1. **(B)** Primer estadio de raya. **(C)** Segundo estadio de raya. **(D)** Primer estadio de mancha. **(E)** Segundo estadio de mancha, se notan levemente hundidas y rodeadas por un halo amarillo. **(F)** Último estadio de síntomas, tercer estadio de mancha, nótese como el centro de la mancha se vuelve grisáceo. Además, en la parte inferior se muestran los periodos evaluados en este experimento según el desarrollo de los síntomas (Murillo, 2015).

El periodo que transcurre desde la aparición de los primeros síntomas y el desarrollo de las rayas y manchas necróticas varía según sea la severidad de la infección, el cultivar y además está estrechamente ligado a la influencia de las condiciones climáticas imperantes (Marín *et al.* 2003).

2.3.4 Epidemiología

La epidemiología de *M. fijiensis* combina varios factores que dificultan en gran medida las prácticas para su control como lo son, su carácter policíclico, la alta susceptibilidad de los clones utilizados en las plantaciones comerciales, la gran capacidad de producir inóculo y la alta capacidad para causar infecciones en el envés de la hoja candela mientras realiza su apertura (Romero 1997; Guzmán *et al.* 2013), ya que según Stover (1972) citado por Alvarado (2002), en el envés de la hoja del banano existen aproximadamente cuatro veces más estomas que en el haz y es por esto que la mayoría de infecciones son producidas en esta superficie. Además, Romero (1997) menciona que en Costa Rica, el monocultivo de grandes extensiones bananeras, el número de hojas que son capaces de producir estas plantas y las condiciones climáticas de las zonas donde se cultiva propician su desarrollo y dificultan su manejo.

Según Guzmán (2003a) y Marín *et al.* (2003) la propagación de la Sigatoka negra está en función de la cantidad de inóculo (conidios y ascosporas) que *M. fijiensis* puede producir. Los conidios dependen de condiciones de alta humedad para formarse, y se benefician mayormente si sobre la superficie de la hoja existe una ligera película de agua. Estas estructuras son formadas en los primeros estadios de la enfermedad, principalmente de la etapa dos a la cuatro y los mismos autores mencionan que la escorrentía y el salpique provocado por la lluvia conforman el principal medio de dispersión de los mismos. Los conidios como fuente de inóculo tienen primordial importancia en épocas de alta precipitación y lloviznas constantes, que provocan niveles de humedad relativa muy altos y a su vez que se forme rocío, favoreciendo la aparición de una película de agua libre sobre la superficie, esencial para el desarrollo de los conidios. Tienen la misma capacidad de causar infecciones y provocar los mismos síntomas que las ascosporas, sin embargo, los conidios no son considerados como la principal fuente de inóculo ya que se producen en pocas cantidades. Los conidios no suelen ser problema en los periodos del año donde la lluvia es ausente y las condiciones para el desarrollo de la enfermedad son menos propicias (Marín *et al.*

2003), no obstante, Jacome *et al.* (1991) y Guzmán (2003a) mencionan que los mismos pueden desempeñar un papel importante en la prevalencia de la enfermedad durante periodos de baja precipitación, debido al agua que queda libre por efecto del rocío, principalmente en la madrugada y en las primeras horas de la mañana.

Por otra parte Guzmán (2003a), Marín *et al.* (2003) y Guzmán *et al.* (2013) mencionan que las ascosporas son consideradas la principal fuente de inóculo causante de las infecciones de Sigatoka negra, ya que una sola lesión puede liberar hasta 15.360 ascosporas (Guzmán *et al.* 2013), dispersadas eficientemente por la acción del viento a largas distancias en los campos de cultivo, favorecidas en su desarrollo y proceso de infección por condiciones de lluvia o alta humedad en el ambiente. Las ascosporas son producidas en estructuras llamadas pseudotecios, los cuales se desarrollan en lesiones maduras de hojas viejas de la planta o en el suelo y tienen la capacidad de poder desarrollarse tanto en el haz como en el envés. Según Guzmán (2006), la esporulación de las lesiones de *M. fijiensis* es mayor por el haz, que por el envés.

Según Stover (1980) las ascosporas son expulsadas del pseudotecio cuando se tiene agua libre de lluvia o de rocío, debido a que los mismos necesitan pasar por un proceso de imbibición y así poder expulsar las ascosporas, las cuales pueden ser llevadas a distancias muy largas por la acción del viento, sin embargo, su efectividad se ve limitada por su gran susceptibilidad a los rayos ultravioletas. El mismo autor menciona que las ascosporas pueden viajar distancias que exceden los 50 Km y causar infecciones en las plantaciones donde lleguen. El número de ascosporas aumenta en condiciones de alta precipitación y humedad relativa, y se ha determinado que la producción de inóculo disminuye en las épocas donde la precipitación disminuye y las temperaturas son bajas (Marín *et al.* 2003). Según Romero y Sutton (1997) durante los meses de mayo a diciembre se encuentran las condiciones propicias para el desarrollo del hongo y es cuando se pueden encontrar mayores concentraciones de ascosporas en el aire, en comparación con los meses de enero hasta abril que se presenta la época de

verano. Así, las zonas de producción que presentan periodos secos mayores a tres meses tienen ventajas en la producción, ya que esto provoca una importante caída en el desarrollo de epidemias, en la reproducción y producción de inóculo del patógeno (Guzmán *et al.* 2013).

Según Stover (1980), Guzmán (2003a) y Marín *et al.* (2003) las esporas de *M. fijiensis* germinan principalmente sobre el envés de las hojas, principalmente sobre las hojas nuevas en su estado de candela, dado que el envés es la superficie que se encuentra totalmente expuesta al patógeno en ese momento. Una vez que las ascosporas llegan a la hoja y germinan, debe pasar un periodo de entre 48 – 72 horas, en condiciones de alta humedad y temperatura que sobrepase los 20 °C para que puedan penetrar en la hoja por medio de los estomas (Stover 1980) y se ha observado que el patógeno puede crecer de manera epifita en un periodo de hasta 6 días antes de penetrar los tejidos de la hoja (Marín *et al.* 2003).

Se han encontrado diferencias en las condiciones de humedad requerida, para que se de la germinación de conidios y de ascosporas. Los conidios germinan en un rango de humedad relativa de 92 a 100 % y las ascosporas necesitan de 98 a 100 % para poder germinar. En cuanto a la temperatura ambos encuentran el óptimo de 26,5 a 28,0 °C (Jacome *et al.* 1991; Guzmán 2003a; Marín *et al.* 2003). Según Jacome *et al.* (1991) la máxima germinación se da cuando existe agua libre sobre la superficie y decrece en condiciones de baja humedad relativa.

2.3.4.1 Periodo de incubación

Según Marín *et al.* (2003), este periodo corresponde al tiempo que tardan en aparecer los primeros síntomas de la enfermedad, luego de que se ha producido la infección, este periodo varía principalmente debido a las condiciones ambientales y la susceptibilidad del cultivar al que esté atacando. Estos autores han encontrado que para Costa Rica los periodos de incubación han sido tan cortos (13 a 14 días) cuando las condiciones son muy favorables para el patógeno y tan largos (35 días) si las condiciones ambientales son desfavorables para el mismo.

Una vez que el patógeno se ha establecido y ha causado la infección, las hifas que desarrolla *M. fijiensis* pueden emerger del estoma y desarrollarse en un conidióforo o de igual manera puede crecer entre el tejido de la hoja y así poder infectar otros estomas cercanos (Stover 1980; Marín *et al.* 2003; Manzo *et al.* 2005), lo que le permite colonizar una mayor cantidad de tejido adyacente y desarrollar síntomas de una forma más rápida. Este proceso se puede desarrollar durante siete días sin mostrar daño o ruptura de células (Marín *et al.* 2003).

2.3.4.2 Periodo de latencia

Según Marín *et al.* (2003), es el tiempo que transcurre desde la infección a la aparición de manchas maduras con presencia de pseudotecios. Este periodo puede ser iniciado por algunos conidios capaces de provocar lesiones y desarrollar los primeros síntomas, sin embargo, este periodo se alcanza principalmente cuando *M. fijiensis* es capaz de producir las lesiones y desarrollar pseudotecios maduros con la capacidad de liberar ascosporas al medio. Este periodo puede variar según sean las condiciones del clima, la susceptibilidad ligada al cultivar, así como la cantidad de inóculo presente, en el caso del Grande Naine se encontraron diferencias muy marcadas en la zona de Guápiles, donde el periodo fue de 70 días durante la estación seca y de tan solo 25 días para la estación lluviosa.

2.4 Diversidad genética de *M. fijiensis*

Según Mourichon (2002) y Rivas-Platero *et al.* (2003) la estructura de una población hace referencia a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones, donde el conocimiento de esta información es de vital importancia para el entendimiento de la biología de los patógenos. De esta forma, conocer la magnitud y distribución de la diversidad genética de *M. fijiensis* es sumamente necesario para llevar a cabo prácticas de mejoramiento y manejo de la resistencia.

Dentro de los estudios de Carlier *et al.* (1996) citado por Chong y Rodríguez (2007) examinaron y analizaron la estructura genética de *M. fijiensis*, detectando grandes diferencias genéticas en las poblaciones estudiadas. La mayor diversidad genética fue encontrada en poblaciones analizadas de Papua, Nueva Guinea y en las Filipinas. Por esta razón los mismos autores propusieron que dicha población forma parte del centro de origen de este patógeno y que las poblaciones de América del Sur, África y de las Islas del Pacífico tenían alelos en común con las poblaciones de Papua y Filipinas pero mostraban una menor diversidad genética. Igualmente Carlier *et al.* (1996) citados por Rivas-Platero *et al.* (2003) mencionan que la recombinación sexual desempeña el papel más importante en la evolución de este patógeno. Según los mismos autores el número de alelos presentes en las diferentes poblaciones de *M. fijiensis* varía entre 1.7 a 7.7 y el índice de diversidad de Nei (H) fluctúa de 0.22 a 0.59. Con esta información los autores detectaron un alto nivel de diferenciación genética entre continentes y sugieren un restringido movimiento de genes a escala global, por lo que proponen que la diseminación del patógeno se ha realizado principalmente a través del movimiento de plantas o material infectado. Además, Müller *et al.* (1997) citados por Mourichon (2002) mencionan que *M. fijiensis* puede mostrar gran diversidad genética en pequeña escala, encontrando grandes diferencias genéticas en un mismo campo.

Rivas-Platero *et al.* (2003) estudiaron la estructura genética de América Latina y África y determinaron que las poblaciones del patógeno con mayor diversidad genética se encontraban en Costa Rica y Honduras (0.31 y 0.36) respectivamente y que los efectos de fundación (es decir que la introducción del patógeno a una nueva área, puede haber involucrado el movimiento de un pequeño número de individuos que representan una limitada fuente genotípica de la población de origen) que han conducido a la introducción del patógeno a nuevas áreas han reducido la diversidad genética.

Según Rivas-Platero *et al.* (2003) el hecho de observar efectos de fundación en la estructura genética de *M. fijiensis* en América Latina y África, son firmes en

que la diseminación del patógeno se ha dado tanto por efectos aleatorios como por el traslado de material infectado a campos limpios de la enfermedad, tanto a escala continental como local, donde las principales causas de esta situación pueden ser atribuidas al movimiento de las esporas por acción del viento, el movimiento de material de siembra contaminado y el uso de hojas de bananos y otras musáceas para la elaboración de alimentos.

Por su parte Chong y Rodríguez (2007) realizaron un estudio entre poblaciones de *M. fijiensis* de fincas tratadas con fungicidas y fincas de manejo orgánico. Estos autores encontraron diferencias genéticas entre las poblaciones, por lo que sugirieron que existe una presión de selección ejercida según sea el tipo de manejo que se lleva a cabo, además de un alto grado de dominancia entre los alelos que posiblemente se relaciona a la presión de selección ejercida por los fungicidas. Esto los llevó también a comprobar que las poblaciones de *M. fijiensis* con manejo orgánico eran muy cercanas genéticamente a una población silvestre y no así una de manejo convencional con la silvestre.

2.5 Combate de la Sigatoka negra

Según Scot (2008) en el cultivo del banano se tiene como objetivo, que las plantas lleguen a la cosecha con un buen número de hojas libres de Sigatoka negra (al menos 10 hojas sanas), que les permita llenar una fruta de buen tamaño y que cumpla con los estándares de calidad requeridos para la exportación. Por esta razón, se necesita integrar algunos conceptos y prácticas que ayuden a tal fin. Así, el número de hojas funcionales a la cosecha (hojas con menos de 30% de la superficie necrosada) es un estimador final de la eficacia en el control de la enfermedad y de la exportabilidad de la fruta cosechada (Ganry *et al.* 2012).

Guzmán (2002), Pérez (2006) y Ganry *et al.* (2012) el manejo de la Sigatoka negra se lleva a cabo de manera tal, que se integren prácticas culturales dirigidas a desfavorecer las condiciones para el desarrollo de las infecciones y el control químico, basado en la aplicación periódica de fungicidas protectantes y sistémicos.

Pérez (2006) menciona que la implementación eficiente de los programas de manejo de la enfermedad, requiere del conocimiento de tres aspectos básicos, que ayuden a su correcta aplicación. En primer lugar se debe conocer las condiciones climáticas imperantes (cantidad y frecuencia de las lluvias), lo que permite inferir sobre la evolución epidemiológica; en segundo lugar, las características biológicas de la plantas, como el ritmo de emisión foliar, hojas más jóvenes con síntomas iniciales y avanzados, severidad de la infección a la parición y a las 7-9 semanas de parida y por último y de vital importancia, el conocimiento de la sensibilidad de las poblaciones del patógeno a los principales fungicidas utilizados en su combate.

2.5.1 Combate cultural

Las prácticas culturales buscan desfavorecer las condiciones necesarias para el desarrollo del patógeno. Dentro de las principales prácticas que se llevan a cabo en este sentido se encuentran la construcción de drenajes para reducir la humedad interna de la plantación y que además contribuyen con el desarrollo del cultivo, el control de malezas que favorecen el microclima necesario para la sobrevivencia del hongo, la deshoja, despunte y cirugía, el control de la densidad así como una nutrición balanceada (Marín *et al.* 2003; Muñoz y Vargas 2003; Pérez 2006, Scot 2008; Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013). Según Etebu y Yong-Harry (2011) tanto la nutrición como la fertilidad del suelo juegan un papel importante en la severidad de la Sigatoka; en estudios realizados en África se ha determinado que en suelos ricos con altos contenidos de materia orgánica la severidad de la enfermedad es menor que en suelos pobres, debido a que las plantas crecen en mejor condición y mayor vigor.

Según Marín *et al.* (2003) y Guzmán *et al.* (2013) la poda sanitaria es la práctica cultural más importante para la reducción del inóculo de *M. fijiensis*, ya sea la eliminación de la hoja completa (deshoje) o parte de ella (despunte o cirugía). Esta práctica regularmente se realiza cada semana o cada dos semanas, antes de que las lesiones logren liberar la mayor cantidad de esporas, además de

que se reduce el tiempo de esporulación (30 días en el suelo vs 3 meses en la planta) y se limita la dispersión de las esporas desde el suelo.

Recientemente se ha trabajado con una práctica llamada “poda temprana o controlada” que consiste en eliminar las tres hojas más viejas de la planta, en la primera semana luego de la floración, lo cual ha dado buenos resultados en la reducción del inóculo sin afectar la producción y calidad de la fruta (Guzmán 2012; Guzmán *et al.* 2013). Además Marín *et al.* (2003) y Guzmán *et al.* (2013) hacen referencia a otras prácticas como el apilamiento de los residuos de la deshoja y la aplicación de una solución de urea al 10% o de microorganismos descomponedores para reducir la esporulación y rápida destrucción del tejido infectado. En África los residuos del deshoje son sacados y quemados fuera de las áreas de cultivo para eliminar totalmente la fuente de inóculo o las hojas son vueltas para que el envés sea el que quede expuesto, ya que la mayor esporulación se da por el haz (Etebu y Yong-Harry 2011).

Según Scot (2008) el manejo de la densidad igualmente puede ayudar en gran medida al control de la Sigatoka negra, al emplearse bajas densidades que permitan en el cultivo una mayor aireación y mejor captación de luz, que ayudan también a que la humedad en las plantaciones disminuya con rapidez luego de fuertes lluvias, además de la deshoja, que favorece el desarrollo del cultivo, se mejora el flujo de aire, se reduce la humedad relativa, hay un mayor aprovechamiento de los fertilizantes y una mejor penetración de las aplicaciones de fungicidas dentro de la plantación, favoreciendo la eficacia en el combate de la enfermedad.

Por otra parte, el mejoramiento genético en el banano ha sido implementado como una estrategia de control cultural, con el fin de encontrar clones o cultivares que muestren algún grado de resistencia a la enfermedad (Marín *et al.* 2003; Pérez 2006). De este modo, la resistencia parcial es ampliamente utilizada en la obtención de híbridos de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), que se manifiesta por el alargamiento del periodo de incubación del patógeno y de la transición de lesiones de los estados iniciales de raya a mancha,

así como la formación de estructuras sexuales y asexuales, lo que permite llegar con un mayor número de hojas funcionales a la cosecha (Pérez 2006).

Scot (2008) menciona que algunos de estos clones de FHIA, además de presentar resistencia parcial a la Sigatoka negra tienen buenas características gustativas. Por su parte Pérez (2006) menciona que en Cuba más de 12.000 ha se encuentran cultivadas con los clones sintéticos tetraploides FHIA 23, FHIA 18 y FHIA 21, los cuales han permitido una disminución importante en los costos de manejo de la Sigatoka negra. El mismo autor menciona que en el largo plazo, en las regiones de alta precipitación, con alta presión de inóculo y severidad de la enfermedad, la resistencia genética sería la única solución económica y ambientalmente factible para la producción bananera. De igual forma Etebu y Yong-Harry (2011) mencionan que el uso de híbridos resistentes a *M. fijiensis* debe formar parte de los programas de manejo integrado de la enfermedad, principalmente para los pequeños agricultores que no pueden sufragar los costos de aplicación de fungidas.

2.5.2 Combate Biológico

Según Guzmán (2012) y Guzmán *et al.* (2013) el combate biológico de la Sigatoka negra no ha sido muy exitoso, principalmente debido a que los microorganismos antagonistas deben luchar también contra el ambiente poco propicio para su desarrollo en el filoplano, ya que se exponen a fuertes cambios de temperatura y humedad, así como baja disponibilidad de nutrientes necesarios para su sobrevivencia. No obstante, en algunas investigaciones se han aislado microorganismos colonizadores (hongos del filoplano) que pueden actuar como potenciales controladores biológicos, mostrando buen efecto de control sobre la enfermedad (Carr 2009). También según Guzmán (2012) en estudios de campo se han aislado algunas bacterias capaces de secretar enzimas líticas (quitinolíticas y glucanolíticas) muy bien adaptadas a las condiciones adversas del filoplano como *Bacillus* spp y *Serratia* spp que en aplicaciones en experimentos bajo condiciones controladas, han mostrado un control similar al control químico.

Según Guzmán (2012) se debe trabajar más fuerte en este tema ya que hasta el momento no existe una alternativa eficiente de control biológico para *M. fijiensis* a nivel de campo, siendo esta una de las principales opciones para el manejo de la enfermedad, dados los serios problemas de resistencia a fungicidas que se están dando. De esta manera, el control biológico y cultural constituyen las principales alternativas para las estrategias futuras de manejo de esta enfermedad.

2.5.3 Combate químico

Según Schwinn (1982a) el uso de químicos es el principal medio de combate de las enfermedades de los cultivos, debido a que son los únicos que garantizan la efectividad del control de la enfermedad. Según Romero y Sutton (1997) y Guzmán *et al.* (2013) el uso de fungicidas ha sido la principal herramienta de combate contra la Sigatoka negra, debido a que las prácticas culturales, no muestran el control necesario. Estos fungicidas se encuentran clasificados en tres categorías: fungicidas protectores, fungicidas de acción sistémica local y fungicidas sistémicos, los cuales difieren en sus mecanismos de acción (Muñoz y Vargas 2003; Marín y Romero 1998 citados por Carr 2009). Según Romero y Sutton (1997) y Scot (2008) en las regiones más propensas a la enfermedad, los fungicidas son utilizados en rotación solos o en mezclas de fungicidas, que incluyen ingredientes activos como mancozeb, maneb, fenbuconazole, azoxistrobina, benomil, propiconazole, tridemorf, aceites destilados de petróleo, entre otros.

En la mayoría de ocasiones, los fungicidas son aplicados en emulsión agua – aceite mineral (Romero y Sutton 1998; Marín *et al.* 2003; Pérez 2006) o sólo en aceite (Marín *et al.* 2003; Pérez 2006) debido a que el mismo tiene efectos fungistáticos, actuando en algún grado como protectante (Muñoz y Vargas 2003; Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013). El aceite mineral inhibe los procesos de desarrollo del patógeno y la evolución de la enfermedad, cuando los tratamientos son realizados en las fases iniciales del desarrollo de los síntomas (Pérez 2006; Etebu y Yong-Harry 2011), además, disminuye los volúmenes de aplicación, haciendo más eficiente la aspersion, dando como resultado una adecuada

distribución del fungicida sobre la hoja y disminuyendo los costos del control (Pérez 2006; Etebu y Yong-Harry 2011; Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013). Los aceites también ayudan a limitar el lavado de los fungicidas por acción de la lluvia (Pérez 2006; Ganry *et al.* 2012) y son usados en el campo a dosis que varían entre 5 y 15 L ha⁻¹ según sea la severidad de la enfermedad, las condiciones ambientales y la presencia o ausencia de poblaciones con algún grado de resistencia a fungicidas (Marín *et al.* 2003).

2.5.3.1 Fungicidas protectores

Este tipo de fungicidas se distribuyen uniformemente sobre la superficie foliar pero no penetran en el tejido de la hoja, de manera tal que forma una película sobre la cutícula de la hoja, que provoca la inhibición de la germinación y crecimiento de los tubos germinativos de las esporas antes de la penetración por los estomas (Muñoz y Vargas 2003; Pérez 2006; Guzmán *et al.* 2013), además inhibe la formación de conidios, al contaminar los conidióforos durante las aplicaciones (Pérez 2006), sin embargo, su efecto es únicamente preventivo (Ganry *et al.* 2012). *M. fijiensis* no ha sido capaz de desarrollar resistencia a este tipo de fungicidas ya que un solo ingrediente activo tiene muchos sitios de acción (multi-sitio), por lo que el riesgo de desarrollo de resistencia a estos compuestos es bajo o nulo. Los fungicidas más utilizados de este tipo en el control de la Sigatoka negra son el mancozeb y el clorotalonil (Muñoz y Vargas 2003; Marín *et al.* 2003; Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013), considerados generalmente como plasmatoxicantes (Dekker 1982). El mancozeb puede ser aplicado en emulsión agua – aceite o sólo en agua, sin embargo el clorotalonil se debe aplicar solo en agua debido a que en presencia de aceite provoca fitotoxicidad (Marín *et al.* 2003).

2.5.3.2 Fungicidas sistémicos

Guzmán *et al.* (2013) mencionan que los fungicidas de este tipo, son los más importantes en el control de la Sigatoka negra. Ganry *et al.* (2012) mencionan que los fungicidas sistémicos poseen propiedades que varían de un grupo químico a

otro, y es común encontrar diferencias en sistemicidad, ya que algunos penetran el tejido foliar y son traslocados vía apoplasto hasta los puntos de mayor transpiración en toda la planta, mientras que otros solo pueden penetrar en la hoja y actuar de manera translaminar (sistémicos locales), los ingredientes activos más sistémicos tienen la capacidad de permanecer durante muchos días en el tejido y desarrollar gran efecto curativo (Pérez 2006; Ganry *et al.* 2012). Su mecanismo de acción es muy específico por lo que el desarrollo de resistencia por parte del patógeno puede ser moderado a alto (Dekker 1982; Brent y Hollomon 2007; Ganry *et al.* 2012 Guzmán *et al.* 2013). Según Pérez (2006) el uso de estos fungicidas ha mejorado en gran medida el control de la Sigatoka negra, especialmente por una mejor distribución del producto sobre las hojas y a la posibilidad de acceso a estructuras del hongo que son desarrolladas en el interior de los tejidos, aunado a una mayor persistencia del fungicida en el interior de la planta, por un efecto más limitado de los factores ambientales.

Según el mismo autor, la absorción y translocación de los fungicidas sistémicos depende de su lipofilia (característica que permite la penetración a nivel de las capas cerosas y la cutícula de la hoja) y solubilidad en agua, factores que afectan sustancialmente la translocación sistémica. De este modo, la eficacia y estrategias de uso de los fungicidas sistémicos en los programas de control, también están influenciados por las características físico - químicas del producto, y la actividad tóxica intrínseca del ingrediente activo contra el patógeno.

Los grupos de fungicidas sistémicos más utilizados para el control de *M.fijiensis* son: los benzimidazoles, triazoles, estrobirulinas (Marín *et al.* 2003, Pérez 2006 y 2012; Guzmán *et al.* 2013), aminas, carboxamidasas, anilinoimidazoles y guanidinas (Pérez 2012; Guzmán *et al.* 2013). En el Cuadro 1 se muestra la recomendación de uso de fungicidas sistémicos realizado por el Comité de Acción contra la Resistencia a Fungicidas (FRAC, por sus siglas en inglés) y en el Cuadro 2 el riesgo de resistencia asociado a cada grupo de fungicidas.

Cuadro 1. Recomendaciones del uso de fungicidas sistémicos en el combate de la Sigatoka negra del banano (Tomado y modificado de FRAC 2014a)

Clase química	Solo o en mezclas	Alternancia o bloques	Máximo # de aplicaciones	Momento de aplicación
Inhibidores de la Desmetilación (DMI)	Solo en mezclas	Solo en alternancia	8 no más del 50% del total de aplicaciones	*
Fungicidas Aminas	Ambos, se prefieren las mezclas	Bloque máximo de 2 aplicaciones consecutivas, se prefiere la alternancia	15 no más del 50% del total de aplicaciones	Sin restricción
Inhibidores Qo (Qol)	Solo en mezclas	Solo en alternancia	3 no más del 33% del total de aplicaciones	**
Anilinopyrimidinas (AP)	Solo en mezclas	Solo en alternancia	8 no más del 50% del total de aplicaciones	Sin restricción
Benzimidazoles (BCM)	Solo en mezclas	Solo en alternancia	3 no más del 33% del total de aplicaciones	**
N-Fenilcarbamatatos	Solo en mezclas	Solo en alternancia	3 no más del 33% del total de aplicaciones	**
Fungicidas SDHI	Solo en mezclas	Solo en alternancia	3 no más del 33% del total de aplicaciones	**
Guanidinas	Solo en mezclas	Solo en alternancia	6 no más del 33% del total de aplicaciones	***
Multi- Sitio	Solo o en mezclas	No hay restricción	No hay límite	Sin restricción

*Iniciar las aplicaciones preferiblemente cuando se inicia la curva progresiva de la enfermedad.

** Preferiblemente con baja presión de la enfermedad; las aplicaciones deben ser separadas por al menos 3 meses entre ellas.

***Preferiblemente con baja presión de la enfermedad; las aplicaciones deben estar separadas por al menos 6 semanas entre ellas.

Cuadro 2. Principales grupos de fungicidas utilizados en el combate de la Sigatoka negra y su riesgo en el desarrollo de resistencia por parte del patógeno. (Tomado y modificado de FRAC 2014b)

Sitio de Acción	Nombre del Grupo	Grupo Químico	Ingrediente Activos	Riesgo de Resistencia	Comentarios
A: Mitosis y División Celular	A1: β -tubulina en la mitosis.	MCB (Metil Benzimidazol Carbamatos)	Benzimidazoles Benomil, Carbendazina, Fuberidazole, Thiabendazole	Alto Riesgo	Resistencia en varias especies de hongos. RC con los i.a del mismo grupo y RCN con N-phenyl carbamatos.
			Thiophanatos Metil-tiofanato		
	A2: β -tubulina en la mitosis.	N-phenyl carbamatos	N-phenyl carbamatos	Dietofencarb	Alto Riesgo
B: Respiración Celular	B1: Complejo III: Citocromo bc1 en el sitio Qo (gen cyt b)	QoI (fungicidas inhibidores de quinona)	Estrobilurinas Azoxytribina, Pyraclostrobin, Picoxytribina, Trifloxistrobina, entre otros	Alto Riesgo	Resistencia en muchos patógenos por mutaciones en el gen del cyt b. RC entre fungicidas del mismo grupo
	B2: Complejo II: Succinato-dehidrogenasa	SDHI (Inhibidores de Succinato dehidrogenasa)	Pyrimidina-Carboxamida Boscalid	Medio Riesgo	Resistencia en varios patógenos por mutaciones en el gen sdh
C: Síntesis de proteínas y aminoácidos	Biosíntesis de metionina	Anilino-Pyrimidinas	Anilino-Pyrimidinas Cyprodinil, Mepanipirim, Pyrimetanil	Medio Riesgo	Resistencia en <i>Botrytis</i> , <i>Venturia</i> y espádicamente en Oculimacula
D: Biosíntesis de esteroides en la membrana celular	D1: C14-demetilasa en la biosíntesis de esteroides	DMI (Inhibidores de la desmetilación)	Triazoles Propiconazole, Difenconazole, Epoxiconazole, Fenbuconazole, Bitertanol, Tebuconazole, Triadimenol, entre otros	Medio Riesgo	Resistencia en muchas especies de hongos, asociada a mutaciones en el gen CYP51, transportadores ABC y otros. Generalmente muestran RC entre fungicidas DMI
	D2: Δ 14-reductasa y Δ 8- Δ 7-isomerasa en la biosíntesis de esteroides	Aminas (morfolinas)	Morfolinas Aldimrph, Dodemorph, Fenpropimorph, Tridemorph	Bajo Riesgo	Decrecimiento en la sensibilidad de Mildiú polvoso. RC dentro del mismo grupo pero no con otros SBI.
			Spiroketal-aminas Spiroxamina		

*RC= Resistencia cruzada; RCN= Resistencia cruzada negativa; SBI=Inhibidores de la biosntesis del ergosterol

2.6 Principales grupos de fungicidas utilizados en el control de Sigatoka negra

Según Romero y Sutton (1997) y Scot (2008) el manejo de la Sigatoka negra se lleva a cabo principalmente mediante la aplicación de mezclas de fungicidas, con diferentes mecanismos de acción. Por su parte Kaars (1982) menciona que para lograr comprender los mecanismos de resistencia a fungicidas, es esencial conocer el mecanismo de acción de los diferentes fungicidas. En general los fungicidas afectan primordialmente la funcionalidad de la membrana celular, ya sea en la biosíntesis de compuestos, procesos de respiración, producción de energía y muy pocos poseen la capacidad de matar las células del patógeno.

2.6.1 Benzimidazoles

A este grupo de fungicidas pertenecen los ingredientes activos, que fueron utilizados inicialmente en el combate de la Sigatoka negra. El benomil, thiabendazol, carbendazim y metil tiofanato forman parte de ellos, los cuales cuando son disueltos en agua forman el compuesto MBC (metil benzimidazol carbamato) por diferentes vías; este es el agente fungitóxico, que actúa bloqueando la formación de microtúbulos al unirse selectivamente con las β -tubulinas fúngicas, lo que impide el acoplamiento de los diámetros de α y β -tubulinas y por ende la mitosis celular. El efecto de los benzimidazoles sobre ascosporas sensibles de *M. fijiensis* es la inhibición total de la germinación o tubos deformados (Pérez 2006). Los benzimidazoles y N-fenil carbamatos presentan el mismo mecanismos de acción (FRAC 2014b).

La resistencia a estos ingredientes activos se da por el cambio de un solo aminoácido en la β -tubulina, sin embargo, las mutaciones que han sido observadas en campo se restringen a solamente dos codones el 198 y 200 (Pérez 2006). Las poblaciones que se consideran resistentes a estos fungicidas, son aquellas que presentan >10% de ascosporas con germinación normal a $10 \mu\text{g m L}^{-1}$ (Pérez 2006).

En la mayoría de áreas productoras de bananos y plátanos en el mundo, se ha detectado la selección de poblaciones de *M. fijiensis* y *M. musicola* con resistencia a los benzimidazoles (Romero y Sutton 1998; Marín *et al.* 2003; Pérez 2006), estas poblaciones son resistentes a altas dosis del ingrediente activo y muestran gran competencia con las poblaciones silvestres (Marín *et al.* 2003; Pérez 2006).

2.6.2 Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE)

Los IBE se encuentran clasificados en dos grupos: los inhibidores de C14 α demetilasa o IDM, de los cuales los más utilizados en musáceas son los triazoles e imidazoles y el otro grupo conformado por las aminas cíclicas, las cuales son inhibidores de D8 – D7 isomerasa, C14 reductasa y escualeno epoxidasa, los más utilizados son las morfolininas y spiroketalaminas (Pérez 2006).

2.6.2.1 Inhibidores de la desmetilación (IDM)

Según Brent y Hollomon (2007) los IDM son utilizados en la agricultura y en el cultivo del banano, desde los años 70, sin embargo la resistencia en *M. fijiensis* fue reportada en la década de los 80. Según Pérez (2006) los triazoles son los fungicidas con este mecanismo de acción, mayormente utilizados para el combate de la Sigatoka negra. Inicialmente se utilizó el propiconazol, que mostraba elevados niveles de control de la enfermedad y otros como el flusilazol, fenbuconazol, tebuconazol, hexaconazol, epoxiconazol, difenoconazol y ciproconazol, con algunas diferencias entre sí, principalmente en cuanto a la eficacia en control, así como la traslocación sistémica en los tejidos de la planta.

Según Fuchs y De Waard (1982) el mecanismo de acción interfiere con la biosíntesis del ergosterol, específicamente inhibiendo el paso c-14 de la demetilación, y se han propuesto diferentes mecanismos de resistencia para los DMI's. El proceso de desarrollo de resistencia a los DMI es en general poligénico, por lo que estos cambios de sensibilidad no causan la pérdida de control de la enfermedad y según Pérez (2006), todos los DMI presentan resistencia cruzada entre ellos.

Según Marín *et al.* (2003) la pérdida de sensibilidad a los triazoles, se ha puesto en evidencia en todas las partes del mundo donde se cultiva banano comercialmente, sin embargo, el uso de estos en mezclas con tridemorph y mancozeb con dosis altas de aceite mineral y prácticas culturales son los principales componentes del manejo de la enfermedad.

2.5.2.2 Morfolina

Según Pérez (2006) y Brent y Hollomon (2007) las morfolinas más utilizadas en el cultivo del banano han sido el tridemorph y fenpropimorh, aplicados en aceite o en emulsión agua – aceite. El tiempo que persisten combatiendo la enfermedad es más corto que el de triazoles y benzimidazoles. El tridemorph inhibe la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ isomerasa y la C14 reductasa, en la ruta metabólica de las síntesis del ergosterol y afecta seriamente la funcionalidad de las membranas celulares fúngicas. Actúa de manera traslaminar y no se reportan casos de resistencia en áreas comerciales de banano, a este ingrediente activo (Pérez 2006). Por su parte el fenpropimorh actúa inhibiendo el paso de la reducción $\Delta 14$ - $\Delta 15$ de la isomerización en la biosíntesis del ergosterol (Brent y Hollomon 2007), y los resultados de eficacia han sido muy similares al tridemorph (Pérez 2006).

Existe evidencia de acción multi-sitio en estos fungicidas, debido a un carácter multi-configuracional en la cadena del carbono, estos fungicidas se han utilizados por muchos años teniendo un buen desempeño a pesar de su extenso uso y no presentan resistencia cruzada con los otros DMI's (Brent y Hollomon 2007).

2.5.2.3 Spiroketalaminas

La spiroxamina se utiliza en las plantaciones de banano de Centroamérica desde el año 2000 en el combate de la Sigatoka negra. Muestra una absorción rápida y su traslocación es acropetal sistémica, lo que ayuda a una buena distribución en la hoja. Actúa principalmente inhibiendo la C14 reductasa además de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ isomerasa y la escualeno epoxidasa (Pérez 2006).

2.5.3 Inhibidores del transporte de electrones en el sitio QoI

Según Pérez (2006) los ingredientes activos mayormente utilizados, con este mecanismo de acción para el control de Sigatoka son el azoxystrobin, el trifloxystrobin, picoxystrobin y el pyraclostrobin, este último incorporado en los programas de manejo en Centroamérica a partir del 2002. Estos fungicidas llamados también estrobilurinas, muestran su mayor eficacia en el control del patógeno cuando se aplica antes de que ocurra la infección. Actúan inhibiendo la germinación de las esporas y el crecimiento de las hifas, además de presentar efectos sobre la formación de fructificaciones en las manchas que son tratadas.

El mecanismo de acción de las estrobilurinas se basa en el bloqueo de la transferencia de electrones en el sitio externo del citocromo bc1 de la membrana externa de las mitocondrias, con eso se inhibe la respiración y por ende la síntesis de ATP (Pérez 2006). Existen 11 diferentes tipos de mutaciones que *M. fijiensis* puede desarrollar en el citocromo b, sin embargo la mayoría de los casos de pérdida de sensibilidad de los patógenos a los QoI, se da por una mutación puntual en el gen cyt b del gen mitocondrial y causa el cambio de glicina por alanina en la posición 143 (G143A) en el citocromo bc1 de la mitocondria. Otra mutación en el citocromo b, relacionada con el desarrollo de resistencia a estrobilurinas, es la sustitución de fenilalanina por leucina en la posición 129 (F129L) que se ha relacionado con pérdidas de sensibilidad más leves, sin embargo esta mutación no ha sido confirmada en *M. fijiensis* (Pérez 2006).

2.5.4. Anilinopyrimidinas

El ingrediente activo de este grupo, que ha sido utilizado en el control de la Sigatoka negra es el pyrimetaniil; el cual inhibe la elongación de los tubos germinativos y la biosíntesis de metionina, por su efecto inhibitorio de la cistationa – liasa y por ende la síntesis de proteínas, con esto además se da lugar a la inhibición de la secreción de cutinasas, pectinasas y celulasas, enzimas necesarias para el patógeno, las cuales son usadas para degradar la pared y causar la infección en el hospedante (Pérez 2006). El mismo autor menciona que

este fungicida además es sistémico y presenta una buena absorción dentro de la hoja y residualidad en la cera, lo que previene pérdidas por el efecto del agua de lluvia, teniendo un efecto estrictamente translaminar.

2.6. Resistencia a fungidas

Según Dekker (1982), el desarrollo de resistencia es una propiedad fundamental de los organismos vivos que se conoce como la adaptabilidad a los cambios de las condiciones ambientales, para poder sobrevivir en otras condiciones y circunstancias adversas, lo que ha permitido la evolución de los organismos en la tierra. En una población silvestre, originalmente sensible a un fungicida, pueden presentarse individuos con menor sensibilidad a ese fungicida, esta disminución en la sensibilidad puede deberse a un cambio genético o no genético (aplicación de fungidas) en la célula del hongo patógeno. Si el decrecimiento en la sensibilidad es provocado por un factor no genético, el cambio no se mantiene estable y puede desaparecer rápidamente cuando se retiran las aplicaciones del fungicida (Dekker 1982).

Georgopoulos (1982a) menciona que la resistencia a los fungidas puede detectarse y medirse de diferentes maneras y depende principalmente de la combinación hongo-fungicida, sin embargo, el principio es el mismo para los diferentes hongos y fungidas. El reconocimiento de las cepas resistentes del patógeno debe realizarse mediante la comparación de resultados obtenidos de cepas o poblaciones silvestres. Además, es esencial establecer la línea base de sensibilidad para una determinada combinación de hongo y fungicida. Para determinar la presencia de cepas resistentes y establecer líneas bases de sensibilidad a fungicida, los estudios deben llevarse a cabo en las mismas condiciones, debido a que la toxicidad del fungicida puede variar significativamente dependiendo de la concentración utilizada, la composición del medio, temperatura, pH, entre otros. Además según el mismo autor cuando ya la resistencia en una cepa o población ha sido detectada, se deben medir dos parámetros. El primero es la extensión de la resistencia, que se refiere a la proporción de la población del patógeno que no muestra la sensibilidad normal de

la población silvestre y el segundo, el grado de resistencia, que hace referencia a la magnitud de la diferencia en la sensibilidad, al compararse con la población silvestre.

Según Guzmán (2003b), Brent y Hollomon (2007) y Beckerman (2013) la resistencia a fungicidas se conoce comúnmente como resistencia adquirida o resistencia práctica (resistencia de campo), la cual se pone en manifiesto por la capacidad de los organismos para sobrevivir y reproducirse luego de la aplicación de fungicidas, por lo que cepas resistentes prevalecen y su control ya no es el adecuado. Generalmente este comportamiento se manifiesta por la combinación de varios factores, que incluyen: la biología del patógeno, el mecanismo de acción del fungicida y el uso repetitivo de un fungicida u otros diferentes con el mismo mecanismo de acción. Por su parte, Scot (2008) menciona que esta resistencia es principalmente el producto de la selección de esporas con un menor grado de sensibilidad, posiblemente dado por una mutación o una recombinación sexual, lo que según Pérez (2006) y Beckerman (2013) genera un gran espectro de genotipos sensibles a resistentes.

En el cultivo del banano el primer hallazgo de resistencia de *M. fijiensis* a fungicidas fue en 1977 en Honduras, cuando el benomil con tan solo dos años de uso continuo ya mostraban menor efectividad y dos años más tarde fue retirado de los programas de control de la enfermedad (Stover 1977 citado por Romero y Sutton 1998; Guzmán 2003b). En Costa Rica la resistencia a este fungicida fue documentada en el año 1991 (Romero y Sutton 1998; Guzmán 2003b). Este fenómeno ha provocado serios problemas en diversas partes del mundo, por ejemplo Stover *et al.* (1978) citados por Romero y Sutton (1998) mencionan que en 1977 la resistencia a benomil, fue la causante de provocar serias epidemias en Honduras. Igualmente en Costa Rica alrededor del año 1991 se detectó una resistencia generalizada a este fungicida, lo que provocó fracasos en el control de la enfermedad, e incrementó el uso del propiconazol (primer IDM utilizado para el combate de Sigatoka negra), al cual el patógeno también tuvo la capacidad de disminuir su sensibilidad, provocando graves problemas en el control de la

Sigatoka negra en las plantaciones bananeras (Romero y Sutton 1998; Guzmán 2003b). Según Guzmán (2003b) este problema fue evidenciado igualmente en Honduras, Guatemala y Belice, y actualmente se ha detectado una pérdida de sensibilidad generalizada a los fungicidas IDM en todos los países productores de banano en Centroamérica y Sur América.

Desde la década de 1960 se han elaborado y han estado disponibles en el mercado, más de 50 fungicidas sistémicos con acción específica, lo que ha resultado además en la aparición de muchos casos de problemas de resistencia a dichos compuestos (Dekker 1982). La aparición de individuos resistentes, por una mutación u otro proceso, no siempre significa que la resistencia al fungicida en la población se acumulará en el campo, ya que depende de varios factores, pero principalmente del “fitness” o aptitud para adaptarse de la cepa resistente.

2.6.1. Tipos de resistencia

Según Brent y Hollomon (2007) y Scot (2008) los patógenos pueden desarrollar resistencia a los fungicidas de varias maneras.

2.6.1.1. Resistencia de un solo paso o disruptiva

Se da en genes principales, este tipo de mutación es responsable de una pérdida repentina y muy marcada en la eficacia de los fungicidas y la aparición de poblaciones menos sensibles y resistentes que tienden a ser muy estables. Si el fungicida al que se desarrolló resistencia se retira de los programas de control, la resistencia puede ser prolongada. En algunos casos, se puede observar una recuperación gradual de sensibilidad, pero puede volver a revertirse rápidamente si se reanuda el uso del fungicida (Brent y Hollomon 2007; Scot 2008).

2.6.1.2. Resistencia paso a paso o progresiva

En este tipo de resistencia varios genes se encuentran involucrados de manera gradual. Se puede observar una progresiva disminución en el control del patógeno y se crea una gama de sensibilidad dentro de la población del patógeno.

Esta resistencia puede revertirse, si el fungicida se utiliza con menor intensidad y se rota con otros fungicidas (Brent y Hollomon 2007; Scot 2008).

2.6.1.3. Resistencia cruzada

Según Georgopoulos (1982c), la resistencia cruzada puede ser de dos tipos: positiva o negativa. La resistencia cruzada positiva sucede cuando un aislamiento de un patógeno disminuye su sensibilidad a dos o más compuestos relacionados en comparación con aislamientos silvestres. Este tipo de resistencia afecta principalmente a fungicidas con mecanismos de acción similares (Dekker 1982; Brent y Hollomon 2007). Por ejemplo, se ha encontrado que cepas de patógenos resistentes a benomil, son casi siempre resistentes o muestran una baja sensibilidad a otros benzimidazoles como la carbendazina y el metil tiofanato (Brent y Hollomon 2007).

Además, Georgopoulos (1982c) menciona que cuando un aislamiento disminuye su sensibilidad a un fungicida, pero se hace más sensible a otro, se trata de un caso de resistencia cruzada negativa. Por ejemplo Alvarez (1991) encontró que aislamientos de *Botrytis cinerea* resistentes a benzimidazoles presentaron gran sensibilidad a N-fenil carbamatos y viceversa.

2.6.1.4. Resistencia múltiple

Este tipo de resistencia se ha encontrado en algunas cepas de patógenos que han desarrollado mecanismos de resistencia a dos o más fungicidas sin relación alguna. Esto puede ocurrir por mutaciones independientes debidas a la exposición del patógeno a cada uno de los fungicidas utilizados en su combate. El origen y mecanismo de la resistencia múltiple es muy distinto al de la resistencia cruzada (Brent y Hollomon 2007).

2.6.2. Mecanismos de resistencia

Según Georgopoulos (1982b) y Brent y Hollomon (2007) se conocen varios tipos de mecanismos de resistencia creados por los patógenos. Entre ellos se

incluye la alteración del sitio bioquímico donde actúa el fungicida, aumento en la producción de la proteína o enzima donde es atacado, pueden también desarrollar una ruta metabólica alternativa evadiendo el sitio de ataque del fungicida y son capaces además, de expulsar el fungicida por medio de las proteínas transportadoras de ATP-asa (detoxificación). De Waard (1997) hace énfasis al mecanismo de acción de las proteínas transportadoras ABC (ATP-binding cassette) responsables de sacar los tóxicos a partir de las células del organismo atacado, como medida de protección. El mismo autor determinó que en mutantes de laboratorio, había un exceso de producción de proteínas ABC, lo que podría causar múltiple resistencia a fungicidas azoles y otros no relacionados y propone que estas proteínas pueden estar relacionadas en patógenos de plantas como transportadores de compuestos de defensa de las plantas o factores de patogenicidad en los hongos.

De todos estos mecanismos el más común es la alteración del sitio bioquímico donde actúa el fungicida, lo que podría explicar por qué a los fungicidas que afectan enzimas principales y que afectan muchos sitios, no pueden desarrollar resistencia, debido a que cambiar muchos sitios simultáneamente es una labor muy difícil para los patógenos. Sin embargo, los fungicidas modernos tienen un mecanismo de acción específico, en un sitio específico, por lo que con una sola mutación en los genes del patógeno puede crear resistencia al fungicida (Brent y Hollomon 2007).

6.2.3 Estrategias para el manejo de resistencia a fungicidas en el cultivo de banano

Según Brent y Hollomon (2007) el desarrollo de programas de combate de enfermedades utilizando fungicidas de sitio específico, debe necesariamente incluir algunas estrategias anti-resistencia que permitan mantener bajo control la enfermedad. Las principales estrategias para reducir el riesgo de desarrollo de resistencia incluyen la utilización de las dosis recomendadas por el fabricante en las etiquetas, seguir las recomendaciones de limitaciones en la frecuencia de aplicaciones de un mismo fungicida o varios con un mismo mecanismo de acción,

y diseñar programas de control con alternancia o mezclas de fungicidas con diferente mecanismo de acción. La combinación de estas medias, asegura un control eficiente de la Sigatoka negra en periodos de alta presión de la enfermedad (FRAC 2012). Algunos fabricantes preparan co-formulaciones, que son mezclas de ingredientes activos seleccionados y mezclados en dosis más adecuadas, lo que da ventaja sobre las mezclas que se realizan en el tanque de aplicación, las cuales necesitan de mayor conocimiento, sobre la compatibilidad y dosis de los ingredientes utilizados. Ya sea el uso de mezclas o la alternancia de fungicidas, debe considerar las dosis y limitaciones en el número de aplicaciones. Aunque no se sabe con certeza cuál es la mejor opción para manejar la resistencia (mezcla o alternancia), cualquiera que se utilice debe hacerse basado en la biología del patógeno, el tipo de cultivo, así como los fungicidas disponibles en el mercado para el patógeno que se esté tratando (FRAC 2010).

6.2.4 Monitoreo de resistencia de *M. fijiensis* a fungicidas sistémicos

Brent y Hollomon (2007) definen el monitoreo de resistencia a fungicidas, como el análisis de muestras extraídas de poblaciones de patógenos de campo, con el fin obtener el grado de sensibilidad del mismo a uno o diferentes fungicidas, conocimiento de gran importancia en la distribución, evolución e impacto causado por la resistencia a nivel de campo. Esta práctica permite conocer el riesgo de desarrollo de resistencia por parte de los patógenos y evita la pérdida de control de la enfermedad.

Según Georgopoulos (1982a) la detección y medición de la resistencia a fungicidas, puede ser llevada a cabo mediante diversos métodos, según sea el hongo y fungicida que se esté evaluando. El investigador será quien adopte el método que crea más apropiado y preciso para su estudio. La germinación de esporas en soluciones de fungicidas o medios de crecimiento que contienen fungicidas, es un método que ha sido ampliamente utilizado para la detección y medición de resistencia al difenil, sodio 2-fenilfenolato y dodine en *N. haematococca*, a benzimidazoles en *V.inaequalis* y a derivados de fentin en *C. beticola*. Es muy importante considerar en este tipo de pruebas además de la

germinación de las esporas, la elongación y morfología de los tubos germinativos en las esporas germinadas. Luego de haber obtenido las respuestas de la población estudiada, expuesta a varias concentraciones del fungicida en el medio, su grado de resistencia puede ser medido al compararse con el tratamiento control o testigo.

Según Ganry *et al.* (2012) la metodología básica para el monitoreo de resistencia para *Sigatoka* negra se basa en la comparación de la sensibilidad a diferentes fungicidas en las poblaciones del hongo, obtenidas de fincas de producción comercial (poblaciones tratadas con fungicidas) y poblaciones que no han sido expuestas a fungicidas (población silvestre). El monitoreo de la sensibilidad es basado en pruebas de germinación de las ascosporas (50-100), cultivadas en medios de agar con diferentes concentraciones de fungicidas, las cuales son comparadas con resultados obtenidos de la germinación de esporas cultivadas en agar. El monitoreo varía dependiendo del grupo al que pertenezca el fungicida que se esté evaluando, como se describe a continuación.

6.2.4.1 Benzimidazoles

Para el monitoreo de resistencia en estos fungicidas se realizan pruebas en medios de agar con diferentes concentraciones de fungicida. Las poblaciones sensibles no germinarán en medios contaminados con fungicida o su tubo germinativo crecerá distorcionado, mientras que en las poblaciones resistentes la germinación será normal o con tubos cortos, cuando son comparados con los resultados obtenidos de esporas creciendo en medios con solo agar (Ganry *et al.* 2012).

6.2.4.2 Inhibidores de la biosíntesis de esteroides

Para este grupo, las pruebas para monitoreo, consisten en medir la longitud del tubo germinativo y con estos datos se calcula un porcentaje de inhibición en el crecimiento, este valor es calculado para cada una de las cepas o poblaciones evaluadas a una concentración de fungicida específica. La distribución de la

inhibición en el crecimiento que muestre la población obtenida de fincas tratadas se compara con la distribución de los resultados obtenidos de la población no tratada con fungicidas. Además, se puede determinar la CE_{50} de la inhibición del crecimiento para cada población evaluada a diferentes concentraciones de un fungicida específico (Ganry *et al.* 2012).

6.2.4.3 Estrobilurinas

Para estos fungicidas los resultados de las pruebas de monitoreo de resistencia, se basan en la medición de la longitud del tubo germinativo y se calcula el porcentaje de inhibición en el crecimiento, para cada población estudiada. Una cepa o población se considera como resistente cuando la longitud del tubo germinativo y el porcentaje de inhibición en el crecimiento son superiores al umbral (Ganry *et al.* 2012).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de los experimentos y periodo de estudio

Esta investigación fue realizada en tres diferentes localidades, cada una con una población de *M. fijiensis*, con diferente nivel de sensibilidad *in vitro* a los fungicidas sistémicos. Así se tuvo total seguridad, de que las tres poblaciones del patógeno fueran genéticamente diferentes y sin influencia de una sobre otra. El desarrollo de la fase experimental de esta investigación, comprendió los meses de mayo a noviembre del 2014.

3.1.1 Finca La Esmeralda del TEC sede en Santa Clara (SC)

Esta finca pertenece al Tecnológico de Costa Rica Sede Regional San Carlos, en Santa Clara, distrito Florencia, cantón San Carlos, provincia Alajuela. Sus coordenadas geográficas son 10°21'43" latitud norte y 84°30'36" longitud oeste, con una altura de 160 m.s.n.m. El promedio de temperatura anual en esta zona es de 26°C y un promedio de precipitación de 3500 mm anuales. Esta finca fue seleccionada por tener una población altamente sensible a los fungicidas, debido a que no se ha ejercido presión de selección sobre dicha población, considerándose así la población silvestre del experimento.

3.1.2. Finca experimental La Rita de CORBANA (LR)

Esta finca es parte de la Estación experimental de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), ubicada en el distrito de La Rita, cantón Pococí, provincia Limón. Geográficamente se encuentra ubicada a 10°15'54" latitud norte y 83°46'26" longitud oeste, con una altura de 135 m.s.n.m. La temperatura promedio anual es de 25 °C con una precipitación de 3406 mm anuales. En esta finca se encuentra una población de *M. fijiensis* con niveles intermedios de pérdida de sensibilidad a los fungicidas, esto por tener un historial de aplicaciones menor al de fincas de producción comercial.

3.1.3. Finca Comercial Palacios de DOLE (PAL)

Esta finca es propiedad de Banacol, se encuentra ubicada en el distrito de Cariari, cantón Pococí, provincia Limón. Su ubicación exacta se encuentra dada por las coordenadas geográficas 10°28'16,5" latitud norte y 83°38'26,2" longitud oeste. Esta finca presenta una altura de 50 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 25,2 °C y precipitación anual de 3465 mm. Aquí se encuentra una de las poblaciones de *M. fijiensis* con mayor pérdida de sensibilidad a los fungicidas, en toda la región bananera de Costa Rica

3.2. Fungicidas a evaluar

Los fungicidas evaluados en el experimento, fueron todos de tipo sistémico y sistémico local, los cuales se describen en detalle en el Cuadro 3. Los mismos fueron aplicados en emulsión agua – aceite (5 L ha⁻¹). Se utilizó aceite mineral Spraytex M[®] e Imbirex[®] como emulsificante a una dosis de 1% del total de aceite aplicado. La dosis de fungicida empleada fue la indicada en la etiqueta por el fabricante.

Cuadro 3. Fungicidas sistémicos empleados en los tratamientos del experimento.

Nombre Comercial (®)	Fabricante	Ingrediente Activo	Grupo Químico	Modo de Acción	Dosis g i.a. /ha ¹	Dosis p.c. /ha ²
Tilt 25 EC	Syngenta	Propiconazole	Triazol	Sistémico	100	400 ml
Sico 25 EC	Syngenta	Difenoconazole	Triazol	Sistémico	100	400 ml
Opus 12,5 EC	BASF	Epoxiconazole	Triazol	Sistémico	100	800 ml
Calixin 86 OL	BASF	Tridemorph	Amina	Sistémico Local	430	500 ml
Impulse 80 EC	Bayer	Spiroxamina	Spiroketalamina	Sistémico Local	320	400 ml
Volley 88 OL	BASF	Fenpropimorph	Amina	Sistémico Local	616	700 ml
Regnum 25 EC	BASF	Pyraclostrobin	Estrobilurina	Sistémico	100	400 ml
Cumora 50 SC	BASF	Boscalid	Carboxamida	Sistémico	400	800 ml
Cycosin 70 WP	BASF	Metil tiofanato	Benzimidazol	Sistémico	196	280 g
Siganex 60 SC	Bayer	Pirymetanil	Anilino pirimidina	Sistémico Local	300	500 ml
Powmyl 25 WP	Sumithomo	Dietofencarb	N-fenil carbamato	Sistémico	200	800 g

1/ g.i.a. = gramos de ingrediente activo

2/ p.c. = producto concentrado

3.3. Material experimental

El material de banano utilizado, fueron plantas obtenidas por cultivo *in vitro* de ápices vegetativos (meristemos) del clon Grande Naine (*Musa AAA*), perteneciente al subgrupo Cavendish, por ser el más utilizado en las plantaciones bananeras comerciales en Costa Rica. Además, se contó con tres poblaciones de *M. fijiensis*: (i) SC= una población silvestre sin historial de aplicaciones de fungicidas, en Santa Clara de San Carlos, (ii) LR= una población con pérdida intermedia de sensibilidad a los fungicidas en la finca experimental de CORBANA en La Rita de Pococí, con historial de aplicaciones de fungicidas en parcelas pequeñas experimentales, pero no tan intensivo como en una finca comercial y (iii) PAL= una población con altos niveles de pérdida de sensibilidad a los fungicidas en la finca comercial Palacios de DOLE en Cariari de Pococí, con amplio historial de aplicaciones de fungicidas sistémicos para el combate de la Sigatoka negra.

3.4. Manejo agronómico

Las tres parcelas fueron establecidas, utilizando el método de siembra en cuadro, con espaciamiento de 2,75 m entre plantas y 2,75 m entre hileras, para una densidad de 1320 plantas por hectárea. Las plantas fueron llevadas directamente al campo con 8 semanas de edad. El día de la siembra se inició con la fertilización, aportando 65 g de DAP por planta, agregados en el hueco de siembra antes de poner la semilla. Tres aplicaciones semanales al 5% con el protector solar (Surround® WP), éstas se realizaron, después de la siembra, para evitar la quema del tejido foliar joven. El manejo nutricional se llevó a cabo mediante la implementación de un plan de fertilización recomendado por la Sección de Suelos y Drenajes de CORBANA para plantaciones nuevas, el cual se resume en el Cuadro 4. En éste se especifica la fuente fertilizante y la dosis por unidad productiva que fue aplicada hasta la novena semana post siembra, y la sucesiva aplicación de la fórmula completa 15–3–31 (N-P₂O₅-K₂O) cada dos semanas, para cumplir con los requerimientos nutricionales del cultivo.

Cuadro 4. Manejo de la fertilización de la plantación según el programa recomendado por la Sección de Suelos y Drenajes de CORBANA

Semana	Producto	Dosis g/up ¹
0	DAP	65
1	Nitrato de calcio	50
2	Nitrato de amonio	50
3	Kmag	50
4	Nitrato de amonio calcáreo	50
5	Magnesamon	45
6	Magnesamon	45
7	Nitrato de Amonio	50
8	Nitrato de amonio calcáreo	50
9	Sulfato de amonio	50
Cada 2 semanas	15 – 3 – 31	50

1/ g/up = gramos por unidad productiva

Se realizaron además 6 aplicaciones de fertilizantes foliares con el fin de corregir algunas deficiencias nutricionales que se presentaron, principalmente de los elementos S y Zn con fuentes fertilizantes como Sulfato de Zinc y algunos

multiminerales. Además, durante el desarrollo de las plantas, se realizaron todas las labores culturales que obedecen a este cultivo. El control de malezas se realizó mediante chapias (guadaña) y aplicaciones dirigidas de herbicidas únicamente en las rondas de los lotes. Además se llevó a cabo el control de plagas insectiles, utilizando Diazinon[®] 60 EC. La deshoja, fue realizada eliminando únicamente hojas senescentes y/o agobiadas y la deshija fue total. La única aplicación de fungicida realizada a las plantas correspondió a los tratamientos del experimento y fue completamente dirigida al área de evaluación.

3.5. Descripción de la investigación

La investigación se realizó con tres ensayos casi simultáneos, uno en cada localidad descrita anteriormente. En cada ensayo se aplicaron todos los tratamientos de fungicidas, en tres diferentes días post infección (8, 12, 16 DPI). Cada parcela experimental contó con un total de 250 plantas de banano, donde fueron aleatorizados los tratamientos según el estado de la candela. En total 185 plantas fueron utilizadas como las unidades experimentales (180 plantas correspondientes a los tratamientos de fungicidas y 5 plantas al testigo absoluto).

La investigación se llevó a cabo en dos etapas, la metodología para cada una de ellas se describe a continuación.

3.6. Etapa I. Evaluación de la sensibilidad *in vitro* de *M. fijiensis* a diferentes fungicidas sistémicos

En esta primera etapa se evaluó el efecto de los 11 fungicidas sistémicos presentes en el Cuadro 3, sobre la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis*. La sensibilidad del patógeno se pone en manifiesto, mediante cualquier alteración en el crecimiento y desarrollo normal de las ascosporas: como la ausencia de germinación, tubos cortos y tubos distorsionados, según sea el mecanismo de acción del fungicida evaluado. Para esto se llevó a cabo una descarga de ascosporas sobre medios de cultivo donde se adicionaron diferentes dosis de los fungicidas sistémicos.

3.6.1. Descarga de ascosporas de *M. fijiensis*

Se utilizó una metodología utilizada y establecida por el Laboratorio de Fitopatología de CORBANA S.A., con la cual se obtienen descargas de ascosporas de *M. fijiensis* de lesiones maduras y con capacidad esporulante (estadio 6 de los síntomas) del patógeno sobre platos de Petri para la realización de los análisis de sensibilidad *in vitro*.

Se recolectaron muestras de tejido foliar con manchas en estadio 6 y con presencia de abundantes pseudotecios, en las tres parcelas del estudio. Dichas muestras fueron colocadas en bolsas de papel, previamente identificadas con el lugar de procedencia y llevadas al laboratorio de Fitopatología de CORBANA S.A. El material se extendió sobre una superficie plana por 24 horas con el fin de eliminar la humedad que estaba presente en el tejido.

Una vez los materiales listos y secos, se procedió a seleccionar y recortar discos de 20 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocados, de las lesiones con mayor presencia de pseudotecios, los cuales pueden ser observados fácilmente a simple vista o con la ayuda de una lupa. Una vez obtenidos los discos, se pegaron cuatro de ellos con grapas metálicas sobre papel bond de 10 cm X 12 cm (120 cm²), de manera tal que el haz del tejido fuera el que quedara expuesto y se identificaron debidamente según el lugar de procedencia. Posteriormente el material fue incubado por 24 horas, en una cámara húmeda (caja plástica transparente con una toalla húmeda). Se tuvo cuidado en que el material vegetal no entrara en contacto con la toalla húmeda, y que la humedad dentro de la cámara no fuera excesiva.

Luego de transcurrir el tiempo de incubación del material, se procedió a preparar las soluciones madre de los fungicidas. Una vez preparada cada solución se agregó en un balón aforado la cantidad necesaria para obtener las diferentes concentraciones deseadas (0,001; 0,01; 0,1; 1,0 y 10,0 mg L⁻¹), luego se aforó el balón con medio nutritivo agar – agua al 2 % y se agitó por dos minutos. De cada balón se difundió de 15 – 20 ml en platos de Petri (100 x 15

mm) y se esperó la solidificación del medio. Cada uno de los platos de Petri fue rotulado, con información de procedencia de la muestra, el fungicida y la concentración del mismo en el medio, con esto los platos quedaron listos para la descarga de las ascosporas.

Para realizar la descarga de las ascosporas en los platos de Petri, las hojas de papel bond con los discos del material infectado, fueron introducidos en un beaker con agua desionizada o destilada por ocho minutos, para lograr la hidratación de los pseudotecios (estado necesario para la expulsión de las ascosporas). Transcurridos los ocho minutos, el material fue sacado del agua y se eliminó el exceso de humedad con una toalla absorbente. Posteriormente los papeles bond con el tejido, fueron colocados sobre los platos de Petri para obtener la descarga, sin exceder los 30 min con el fin de evitar la contaminación del medio con otro tipo de hongos. Sobre la parte externa del fondo del plato, se marcaron los puntos de descarga de las ascosporas, para facilitar la revisión posterior en cada uno de los puntos. El papel con el material vegetal se retiró del plato de Petri, y se comprobó si hubo descarga colocando los platos de Petri contra la luz, ya que a simple vista se pueden observar las descargas masivas de ascosporas en el medio.

Terminadas las descargas y su comprobación, los platos de Petri fueron sellados con papel parafilm y se colocaron dentro de una incubadora (Precision Scientific[®]) a una temperatura de 26 - 27 °C, por un periodo de 48 horas, tiempo en el cual el tubo germinativo de las ascosporas se comienza a desarrollar. Por último, los platos de Petri fueron colocados en refrigeración, a una temperatura aproximada de 8–10 °C hasta que se realizaron las lecturas de los tubos germinativos.

3.6.2. Variables de evaluación

Los análisis fueron realizados para todos los fungicidas, en cada una de las poblaciones evaluadas. Se contó con dos repeticiones para cada fungicida y concentración en cada población, para un total de 330 platos de Petri analizados.

La lectura de los tubos germinativos se llevó a cabo utilizando un microscopio Olympus® modelo CH-2, identificando el efecto de cada fungicida sobre la germinación de las ascosporas (Figura 3). De esta manera, las ascosporas fueron clasificadas como: ascosporas con germinación normal (N), ascosporas no germinadas (NG), con tubos cortos (TC) y tubos distorsionados (TD).

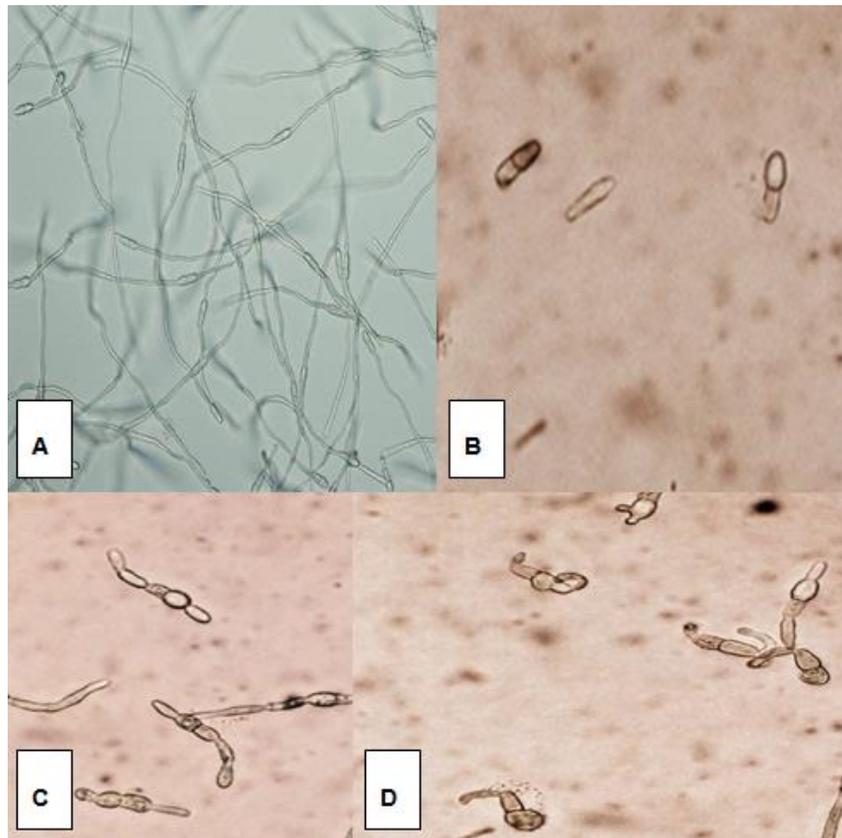


Figura 3. Clasificación de las ascosporas de *M. fijiensis* según el efecto causado por los diferentes fungicidas. **(A)** Germinación normal, **(B)** No germinadas, **(C)** Tubos cortos, **(D)** Tubos distorsionados. CORBANA, 2015.

El efecto de cada fungicida fue evaluado por la respuesta obtenida de las ascosporas en cada plato de Petri (100 ascosporas por concentración), en comparación con un testigo altamente sensible. Estos datos luego fueron comparados con las respuestas obtenidas en campo en la II etapa del experimento.

3.6.3. Análisis de los datos

Se calculó el porcentaje de inhibición en la longitud del tubo germinativo de las ascosporas para los diferentes fungicidas en todas las concentraciones y con esta información, mediante un análisis de regresión lineal del logaritmo natural entre las concentraciones utilizadas y los porcentajes de inhibición de las ascosporas se determinó la Concentración Efectiva Media (CE_{50}) de cada uno de ellos en las tres poblaciones del patógeno.

Mediante la elaboración de gráficas se mostró el comportamiento de la sensibilidad de *M. fijiensis* en las diferentes concentraciones utilizadas para cada una de las poblaciones evaluadas.

3.7. Etapa II. Aplicación y evaluación de los tratamientos de fungicidas a nivel de campo.

Esta etapa inició 13 semanas después de la siembra. Primeramente se realizó un muestreo de la severidad de la enfermedad, utilizando para tal fin la escala de severidad de Stover, modificada por Gauhl (1989) que se presenta en el Anexo 1. Para realizar la evaluación se enumeraron todas las plantas en las tres diferentes parcelas, de manera tal que se inició en la primera hilera (izquierda a derecha), y donde terminaba esa hilera, la numeración seguía de manera consecutiva en la hilera del lado y así continuamente hasta el final del lote. La evaluación fue realizada a todas las plantas con número impar y tomando en cuenta todas las hojas presentes en la planta, con la información obtenida se realizó el cálculo del índice de infección y por medio de Sistemas de Información Geográfica, se elaboró un mapa del índice de infección en toda el área para cada una de las parcelas (Anexo 5). Con esto se estimó la presión que estaba ejerciendo la enfermedad y la uniformidad en la distribución de la enfermedad.

Los tratamientos fueron aplicados en tres diferentes días post infección (8, 12, 16 DPI), con el fin de evaluar la capacidad curativa de los diferentes fungicidas. El día de la infección fue marcado en la semana 13 después de la siembra y todas

las plantas de la parcela fueron identificadas con una cinta blanca, en la cual se indicó el estado de apertura de la hoja candela según la escala de Brun (1963) (Anexo 2). Con dicha información se procedió a realizar la aleatorización de todos los tratamientos, según la cantidad de plantas en cada parcela con el mismo grado de apertura de la candela. De esta manera, se realizaron dos repeticiones para cada uno de los tratamientos en los diferentes días post infección en candelas con grado 2, una repetición en candelas que mezclaban grados 0 y 2, una repetición en candelas con grado 4 y una repetición en plantas con candelas en grado 8. El área de aplicación se marcó en la porción izquierda de la hoja (25% distal de la hoja, vista por el haz) correspondiente a la candela marcada el día de la infección, utilizando marcadores de tinta indeleble y un molde de cartón, el cual permitía trazar rectángulos de 8 x 10cm, medidas adecuadas al área de la mini torre de aspersión.

3.7.1. Pruebas preliminares para la determinación del volumen y calibración del equipo de aplicación.

Se realizaron pruebas preliminares a la aplicación de los tratamientos de fungicidas en el campo, con el fin de determinar el volumen adecuado para lograr una buena cobertura del fungicida en el área de aplicación. Las pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de CORBANA, utilizando los mismos instrumentos de aplicación en el campo, la mini torre de aspersión, modificada por CORBANA, según el modelo de Calpouzos (1962) y un aerógrafo (Titan[®], modelo BD-132A), en este caso adaptado a un compresor eléctrico regulado a una presión de 20 psi. Las pruebas se llevaron a cabo sobre papel bond marcado con el área de la mini torre y se utilizó una mezcla de agua+colorante rojo para poder identificar la cobertura. Se efectuaron pruebas para un volumen total de 250 L ha⁻¹ y de 350 L ha⁻¹, tomando alícuotas de 0,2 y 0,28 ml respectivamente para el área de 80 cm² (área que comprende la torre). Las pruebas fueron repetidas en varias ocasiones y según la cobertura observada, se determinó el volumen adecuado de aplicación para las pruebas de campo.

3.7.2. Aplicación de los tratamientos

Las aplicaciones de fungicidas iniciaron después de transcurridas 14 semanas post siembra, luego de la evaluación de severidad de la enfermedad y de tomar las muestras de tejido foliar necesarias para los análisis de sensibilidad *in vitro*. La aplicación fue realizada utilizando una mini torre de aspersión, modificada por CORBANA, según el modelo de Calpouzos (1962), cuyas medidas internas son 10 cm x 8 cm y altura de 26 cm, y un aerógrafo (Titan[®], modelo BD-132A), el cual se coloca sobre la parte superior de la mini torre (Figura 4).

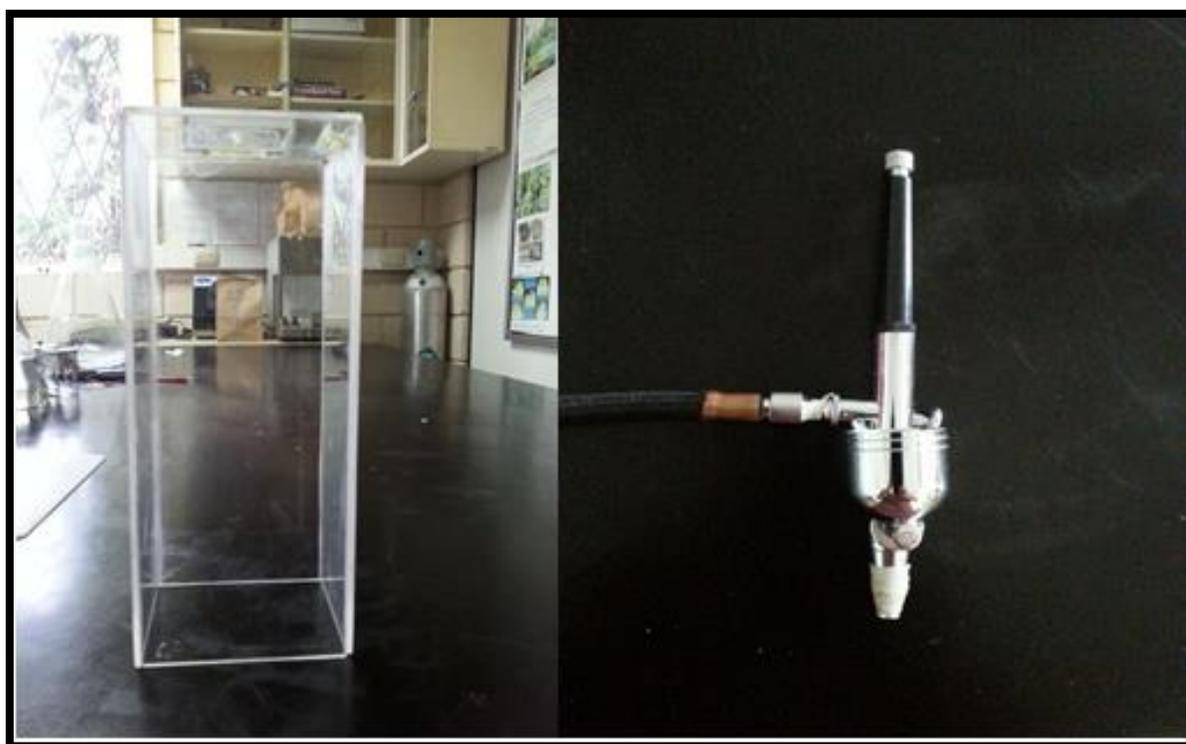


Figura 4. (A) Mini torre de aspersión, modificada por CORBANA, según el modelo de Calpouzos (1962). **(B)** Aerógrafo Titan[®], modelo BD-132A, utilizado en las pruebas de determinación del volumen de aplicación y en la aplicación de tratamientos en las parcelas experimentales (Santa Clara, La Rita y Palacios). Murillo, 2015.

Los fungicidas fueron aplicados en emulsión (agua–aceite) a las dosis indicadas en las etiquetas por el fabricante, con 5 L ha⁻¹ de aceite mineral (Spraytex M[®]) y emulsificante (Imbirex[®]) al 1% del total de aceite aplicado, para un volumen total de aplicación de 350 L ha⁻¹. La preparación de las emulsiones de fungicidas, fue realizada el día anterior a la aplicación, cada uno se preparó de la siguiente manera: en un beaker de 200 ml se agregó la dosis de aceite (2,14 ml) y emulsificante (0,02 ml). Luego se agregó 50 ml de agua destilada, y se puso en agitación la mezcla por 3 min utilizando agitadores magnéticos. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a agregar la dosis del fungicida requerido y se siguió agitando por otros 3 min. Luego de este tiempo se agregaron 100 ml de agua destilada para completar el volumen de emulsión total de 150 ml y se continuó agitando por 5 min. La preparación de la emulsión de cada uno de los fungicidas se llevó a cabo siguiendo la misma metodología.

Se utilizó una micropipeta, para dosificar el fungicida dentro de la copa del aerógrafo para tal fin, tomando alícuotas de 0,28 ml correspondientes al volumen de emulsión necesario para el área de 80 cm² donde se aplicaron y evaluaron los tratamientos. El aerógrafo se conectó a un cilindro de aire comprimido que permitió realizar la aspersion del líquido contenido en el aerógrafo, sobre la superficie de la hoja previamente marcada para la aplicación. Con este equipo las aplicaciones fueron totalmente dirigidas a un área delimitada, y se evitaron problemas de deriva, la forma de aplicación de los tratamientos se puede observar en la Figura 5.



Figura 5. Forma de aplicación de los tratamientos en el campo. En la figura se puede notar la conexión del aerógrafo al cilindro de aire comprimido que permitió la aspersión del fungicida, además de la colocación de la mini torre de aspersión sobre el área previamente marcada y el soporte colocado debajo de la hoja para evitar cualquier daño mecánico en la misma. Murillo, 2015.

Las aplicaciones de los tratamientos se hicieron en bloques por repeticiones, es decir, se aplicó una repetición de todos los fungicidas a la vez y con una aleatorización diferente en cada bloque, esto para tener una repetición de todos los tratamientos en el tiempo. Para realizar las aplicaciones se contó con dos aerógrafos y dos mini torres, con el fin de agilizar la aplicación. Después de aplicar un tratamiento con el aerógrafo, este fue lavado una vez con jabón y dos veces con agua, con el fin de garantizar la inocuidad del equipo y evitar problemas de residuos del fungicida aplicado anteriormente que pudieran afectar los resultados del ensayo.

3.7.3. Variables de evaluación de los tratamientos

Las variables de evaluación que se incluyeron para todos los tratamientos fueron:

1. Periodo de incubación (PI): es el tiempo que transcurre a partir del día de la infección, hasta la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad (estrías), estadíos 1 y 2 de la enfermedad.
2. Periodo en alcanzar el primer estadio de mancha (PE4): es el tiempo transcurrido desde el día de la infección hasta la aparición de la primera mancha (estadío 4 de los síntomas).
3. Periodo de latencia (PL): es el tiempo transcurrido desde el día de la infección, hasta la aparición de la primera mancha con estructuras de reproducción sexual (pseudotecios), estadio 6 de los síntomas.
4. Porcentaje de necrosis en el área aplicada (severidad).
5. Porcentaje de eficacia de los fungicidas.

Las evaluaciones se iniciaron una semana después de la aplicación y luego cada dos a tres días hasta que todos los tratamientos cumplieron con el PI, la aparición del primer estadio de mancha (estadío 4) y el PL. Las evaluaciones correspondientes a los porcentajes de severidad o necrosis en las áreas aplicadas iniciaron cuando se empezaron a notar los primeros estadios de mancha y luego cada 4-6 días hasta que los testigos alcanzaron el 100% de necrosis.

La severidad fue evaluada como el porcentaje de tejido necrosado (manchas de *M. fijiensis*) en el área aplicada. Las evaluaciones se realizaron utilizando una cuadrícula de 80 cm², diseñada en una lámina transparente con divisiones de 1 cm², para determinar el porcentaje de tejido necrosado en dicha área (Figura 6).

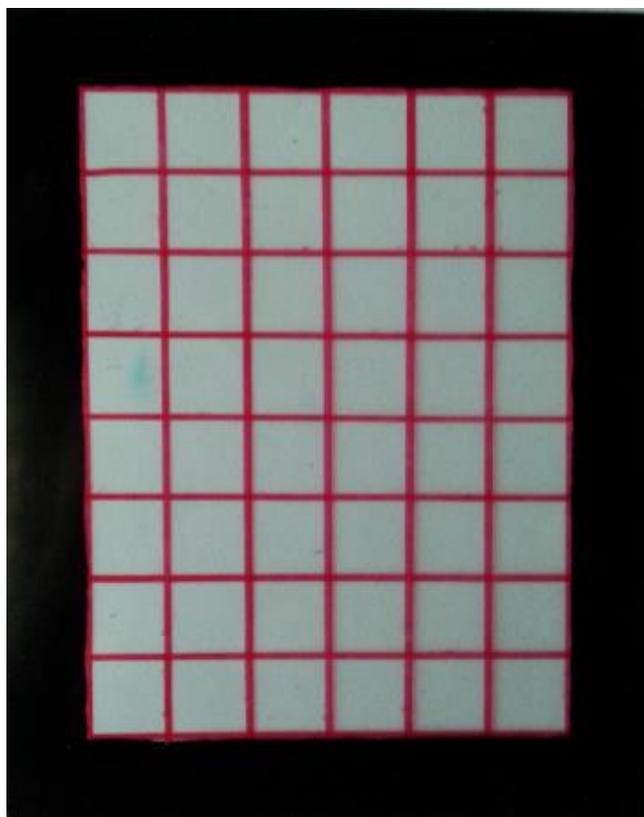


Figura 6. Cuadrícula utilizada para la evaluación de la severidad (% de necrosis) en el área aplicada con los diferentes tratamientos incluidos en el experimento. Murillo, 2015.

En la cuadrícula se sombreó un borde de 1 cm², para evitar cualquier efecto causado por la tinta indeleble de los marcadores o que la cobertura del fungicida en el área aplicada no hubiese sido suficiente, cerca de los bordes de la mini torre de aspersión. La cuadrícula diseñada para estas evaluaciones tenía un total de 80 cuadros de 1 cm², de los cuales, una vez sombreado el borde quedaron 48 cuadros. De esta manera, la severidad fue calculada de la siguiente forma:

$$\text{Severidad (\%)} = \left(\frac{\# \text{ de cuadros necrosados en el área de evaluación}}{48 \text{ (total de la cuadrícula)}} \right) * 100$$

Con los valores de los porcentajes de necrosis de los tratamientos y el testigo relativo (aceite) y absoluto, se calculó el porcentaje de eficacia de los fungicidas en los diferentes DPI, en que fueron realizadas las evaluaciones. Así, la eficacia

de los fungicidas fue calculada en base al testigo relativo, ya que todos fueron aplicados en emulsión con aceite y la eficacia del testigo relativo fue calculada en base al testigo absoluto, utilizando la siguiente fórmula:

$$Eficacia (\%) = \left(\frac{\text{severidad del testigo (absoluto o relativo)} - \text{severidad del tratamiento}}{\text{severidad del testigo (absoluto o relativo)}} \right) * 100$$

La severidad y la eficacia de cada uno de los tratamientos fueron medidas, hasta que los testigos relativo y absoluto alcanzaron el 100% de necrosis en el área de evaluación.

Los resultados obtenidos en esta II etapa, fueron comparados con los resultados de la I etapa. De esta manera se determinó si existe alguna correlación entre la pérdida de sensibilidad *in vitro* mostrada en el laboratorio y la pérdida de eficacia de los fungicidas en el campo (resistencia práctica) en las diferentes poblaciones de *M. fijiensis* que fueron analizadas.

3.8. Diseño estadístico y arreglo de los tratamientos

En el experimento fue utilizado un diseño Irrestricto al Azar con arreglo factorial (12 x 3), donde el primer factor corresponde a los 11 fungicidas sistémicos (Cuadro 3) y el aceite mineral y el segundo factor corresponde a los tres diferentes días post infección (8, 12 y 16) en que se realizaron las aplicaciones de los tratamientos.

3.8.1. Modelo estadístico

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + (A * B)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

μ = Media general

A_i = Efecto de los fungicidas sistémicos

B_j = Efecto de los días post infección

$(A * B)_{ij}$ = Efecto de la interacción de los fungicidas y los días post infección

ϵ_{ij} = Error experimental

3.8.2. Descripción de los tratamientos

En el Cuadro 5 se pueden observar los 13 tratamientos que componen el experimento, cada uno aplicado a los 8, 12 y 16 DPI.

Cuadro 5. Tratamientos aplicados en el experimento en cada una de las parcelas experimentales (Santa Clara, La Rita y Palacios). CORBANA, 2014.

Tratamiento	Fungicida	Grupo químico
T1	propiconazole	triazol
T2	difenoconazol	triazol
T3	epoxiconazole	triazol
T4	tridemorph	amina
T5	spiroxamina	spiroketalamina
T6	fenpropimorph	amina
T7	pyraclostrobin	estrobilurina
T8	boscalid	boscalid
T9	metil tiofanato	benzimidazole
T10	pirymetanil	anilinopirymidina
T11	dietofencarb	N- fenil carbamato
T12	aceite	---
T13	testigo	---

Los tratamientos fueron derivados de la interacción de los factores del modelo estadístico, dando como resultado un número de 36 tratamientos (12x3), con 5 repeticiones cada uno, esto da como resultado 180 unidades experimentales y 5 repeticiones del testigo absoluto (T13) para un total de 185 unidades experimentales. Los tratamientos fueron distribuidos al azar en todo el lote según el estado de candela de cada planta, en el día marcado como el día de la infección.

3.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el software (SAS/STAT® 9.2). Mediante el análisis de la varianza se detectaron los efectos causados por los tratamientos de fungicidas, los DPI y la interacción entre ambos factores, además de evaluar el efecto de los diferentes estados de apertura de la hoja candela de las plantas donde se aplicaron los tratamientos, incluidos como una covariable.

Por medio de contrastes ortogonales se comparó el efecto de fungicidas del mismo grupo químico, y de estos contra los demás y el testigo (aceite). Además, mediante una prueba de separación de medias (LSD Fisher) se detectaron los tratamientos que superaron a los testigos en las diferentes evaluaciones. Se tomaron en cuenta principalmente los efectos mostrados con 5% de significancia (P=0,05); sin embargo, se incluyeron también algunas diferencias entre tratamientos encontradas con 10% de significancia. Por otra parte, se comparó el efecto de los testigos (relativo y absoluto), utilizando para tal fin una prueba de T de Student y tomando en cuenta un nivel de significancia de 5% (P=0,05)

Los datos no cumplieron con los supuestos del análisis de varianza, por ende se realizó la transformación:

$$Y = \text{Arcoseno} \sqrt{\frac{\text{Porcentaje de severidad}}{100}}$$

La transformación no tuvo efecto, debido a una alta heterogeneidad de varianzas, lo que está muy ligado a la no normalidad de los datos, y aunque se logró disminuir un poco esta heterogeneidad, los resultados de los análisis transformados llevan a las mismas conclusiones de los datos no transformados, por lo que los que se presentan corresponden a los datos sin transformar

4. RESULTADOS

4.1. Etapa I. Evaluación de la sensibilidad *in vitro* de *M. fijiensis* a diferentes fungicidas sistémicos

En el Cuadro 6 se presentan los porcentajes de inhibición en el crecimiento del tubo germinativo de las ascosporas descargadas en medios de agar-agua al 2%, con diferentes dosis de los fungicidas para las tres poblaciones del patógeno que fueron evaluadas. Por otra parte, en la Figura 7, se muestran estos mismos porcentajes con el fin observar con mayor facilidad la pérdida de sensibilidad en las poblaciones del hongo. Se tomaron como dosis discriminantes 0,01 y 0,1 mg L⁻¹, estas concentraciones fueron marcadas en las gráficas mediante un recuadro amarillo (Figura 7).

En el caso del propiconazole, se aprecia la pérdida de sensibilidad del patógeno en las poblaciones de La Rita (LR) y Palacios (PAL). A la dosis de 0,01 mg L⁻¹, el porcentaje de inhibición en la población silvestre (SC) fue de 69,2%, mientras en LR y PAL fue de 53,4% para ambas poblaciones, mostrando una reducción de 15,8% de la sensibilidad en ambas poblaciones. Para la dosis de 0,1 mg L⁻¹ la situación fue muy similar y se dio un leve incremento en los porcentajes de inhibición, así en Santa Clara (SC) la inhibición fue de un 73,4% y en LR y P 60,5 y 58,6%, respectivamente; con 13,0% y 14,8% de reducción en sensibilidad en el mismo orden. Sin embargo, a concentraciones mayores 1,0 y 10,0 mg L⁻¹ las poblaciones resistentes muestran porcentajes de inhibición muy similares a la población silvestre e inclusive, la población de PAL se inhibió un 5,1% más que la población silvestre a 1,0 mg L⁻¹. Cabe mencionar que la población de LR presenta una mayor de pérdida de sensibilidad, como lo indican los valores de CE₅₀ (Cuadro 7)

El difenoconazole presentó una situación similar, donde la mayor diferencia en sensibilidad se notó a la concentración de 0,01 mg L⁻¹. En SC a esta concentración el porcentaje de inhibición fue de 71, 1%, en LR de 37,6% y en PAL

de 58,5%, evidenciándose por mucho la mayor pérdida de sensibilidad en la población de LR con 33,5% menos de inhibición en el crecimiento del tubo germinativo, mientras que en PAL la disminución fue solo de 12,6%. A la dosis de 0,1 mg L⁻¹ las diferencias en sensibilidad se vieron reducidas, así en la población de SC el porcentaje de inhibición fue de 72,5%, en LR de 63,8% y en PAL de 62,4%. Entre estas dos últimas poblaciones no hubo diferencias, pero si cuando fueron comparadas con la población silvestre (SC; 9,4%) en promedio. Al igual que el propiconazole este ingrediente activo a las concentraciones de 1,0 y 10,0 mg L⁻¹ muestran casi la misma sensibilidad que la población silvestre (SC). No obstante, la población de PAL, presentó menor pérdida de sensibilidad, como se muestra en el valor de CE₅₀ (Cuadro 7).

Con el epoxiconazole, la población de PAL se mostró más sensible que la población silvestre (SC). A la dosis de 0,01 mg L⁻¹ la población de PAL mostró un 61,5% de inhibición, mientras que en SC y LR se inhibió en un 47,9% y 47,7% respectivamente, con una diferencia promedio de 13,7% entre estas y la población de PAL. Para la concentración de 0,1 mg L⁻¹ la diferencia fue menor, en la población de PAL se inhibió un 75,0% del desarrollo de los tubos germinativos, en SC 67,4% y en LR 63,6%. En las evaluaciones a 1,0 mg L⁻¹ se nota una leve pérdida de sensibilidad en la población de LR con respecto a SC, sin embargo, a 10,0 mg L⁻¹ la misma supera también el porcentaje de la población silvestre pero no a PAL. En este caso se podría decir que tanto la población de SC como la de LR muestran una leve pérdida de sensibilidad en comparación con la población de PAL, siendo mayor en LR según el valor de EC₅₀ (Cuadro 7).

Para el tridemorph la situación fue similar al epoxiconazol, pues a la dosis de 0,01 mg L⁻¹ el porcentaje de inhibición fue mayor en la población de LR, donde se inhibió un 63,8%, en SC 54,9% y en PAL 53,5% con una diferencia promedio de 9,6% entre éstas y la población de LR.. En la dosis de 0,1 mg L⁻¹ la población silvestre (SC) muestra el mayor nivel de inhibición con 70,1%, en LR 64,6% y en PAL un 58,8%, evidenciándose una leve pérdida de sensibilidad principalmente en la población de PAL, como se muestra en el valor de CE₅₀ (Cuadro 7). Este

comportamiento fue muy similar a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, sin embargo, a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ las tres poblaciones mostraron el mismo nivel de sensibilidad a este compuesto.

En el caso de la spiroxamina se observó una gran pérdida de sensibilidad en la población de PAL y más leve en LR. A la concentración de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ en la población silvestre (SC) inhibió un 77,7%, en LR 69,8% y en PAL tan solo 35,7%, esta última con una diferencia de 42,0% menos de inhibición con respecto a la población silvestre. En LR la pérdida de sensibilidad fue de solo 8%. Para $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ la tendencia fue la misma, en la población silvestre el porcentaje de inhibición se mantuvo con 78,0%, mientras que en LR se incrementó a 74,7% y en PAL a 52,8% mostrando igualmente la mayor pérdida de sensibilidad. Como en los casos anteriores, a la dosis de 10 mg L^{-1} las poblaciones menos sensibles inhiben casi al mismo nivel que la población silvestre. No obstante, en los valores de CE_{50} (Cuadro 7) se nota claramente la pérdida de sensibilidad, principalmente en la población de PAL.

El fenpropimorph se mostró altamente efectivo ante la población silvestre (SC), pues a la concentración de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ presentó el 100% de inhibición, en LR un 69,9% y en PAL 78,4%, mostrándose una mayor pérdida de sensibilidad la población de LR con 30,1% menos de inhibición en comparación con la población silvestre (SC), mientras que en PAL la pérdida de sensibilidad fue un poco menor, con 21,6% de diferencia. A la concentración de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ se dio una disminución en el porcentaje de inhibición en la población silvestre, la cual se inhibió en un 93,5%, en LR 74,36% y en PAL 77,8%. A esta concentración las poblaciones de LR y PAL mostraron una pérdida de sensibilidad muy similar, con un promedio de 17,5% menos de inhibición y como se ha visto en los otros fungicidas, al incrementar la dosis del mismo, las poblaciones menos sensibles inhiben casi al mismo nivel que la silvestre. Como se puede observar a 10 mg L^{-1} , la población de PAL muestra la misma sensibilidad que la de SC, mientras que la población de LR también muestra un incremento en su sensibilidad con tan solo 12% de diferencia con las otras poblaciones. Los valores de EC_{50} (Cuadro 7) de las tres

poblaciones no pudo ser determinada con exactitud pues en todas fue $< 0,001 \text{ mg L}^{-1}$, que corresponde a la menor concentración evaluada.

Con respecto al pyraclostrobin, la pérdida de sensibilidad en LR y PAL fue evidente. Para la concentración de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ en la población silvestre (SC) el porcentaje de inhibición del tubo germinativo fue de 90,3%, en LR de 84,4% y en PAL de 68,4%. La pérdida de sensibilidad del hongo a este fungicida con respecto a la población silvestre fue de 21,9% en PAL y 6,0% en LR. A la concentración de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ la situación fue muy similar, en la población silvestre se alcanzó un 93,4% de inhibición, seguido de LR con 75,4% y en PAL 58,5% mostrándose una mayor pérdida de sensibilidad a esta concentración. Sin embargo, como se observó en los otros fungicidas, al aumentar la concentración del fungicida en el medio, la sensibilidad de las poblaciones de LR y PAL aumentó, así a la concentración de 10 mg L^{-1} la sensibilidad de la población de PAL casi iguala el porcentaje de inhibición de la población silvestre (SC) y la población de LR logró superar su nivel de sensibilidad y alcanzó el 100% de inhibición. Las CE_{50} de las tres poblaciones no se lograron calcular con exactitud ya que fueron menores a la mínima concentración evaluada ($< 0,001 \text{ mg L}^{-1}$; Cuadro 7).

Con el fungicida boscalid los porcentajes de inhibición en la población silvestre (SC) se mantuvieron casi al mismo nivel en todas las concentraciones. El porcentaje de inhibición en esta población a $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ fue de 83,0% en LR de 49,33% y en PAL de 67,8%, notándose claramente la mayor pérdida de sensibilidad en la población de LR con 33,7% menos de inhibición en la longitud de los tubos germinativos, mientras que en PAL la diferencia fue de 15,2%. La sensibilidad aumentó en la concentración de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ en las poblaciones de LR y PAL y disminuyó levemente en la silvestre (SC), de esta manera en la población de SC se inhibió en un 80,2%, en LR un 63,2% y en PAL 74,0%.

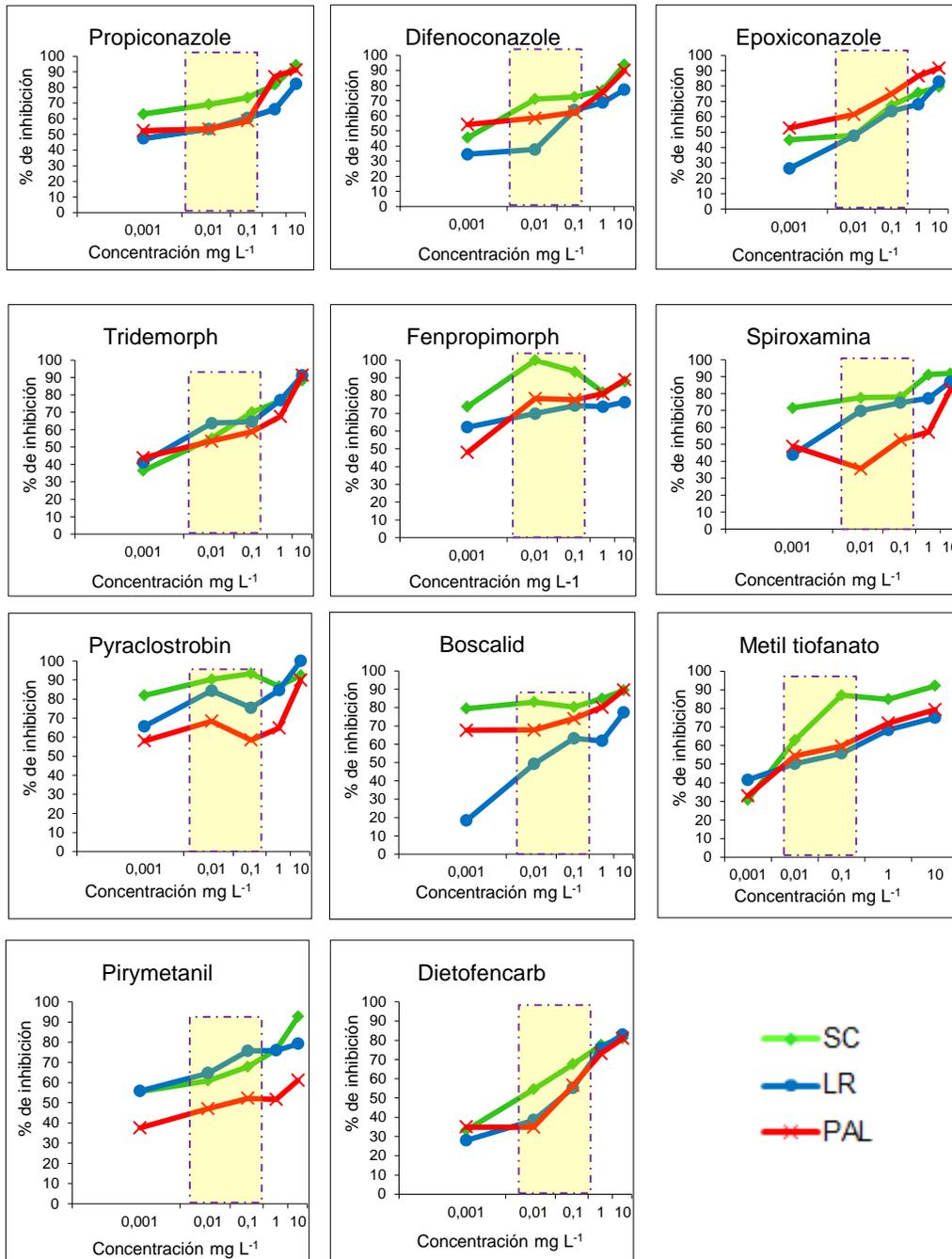


Figura 7. Porcentajes de inhibición del tubo germinativo de las ascosporas de tres poblaciones de *M. fijiensis* descargadas en medios con agar-agua al 2% y a diferentes concentraciones de los fungicidas, luego de ser incubadas por 48 horas a 26-27 °C. Murillo, 2015.

No obstante, a la concentración de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ las poblaciones de SC y PAL mostraron la misma sensibilidad y la población de LR presentó un 12% menos de inhibición en comparación con la población SC y PAL. La población de LR presentó el valor más alto de EC_{50} ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$), mientras que para SC y PAL fue $< 0,001 \text{ mg L}^{-1}$ (Cuadro 7).

En el caso del metil tiofanato los porcentajes de inhibición de la longitud de los tubos germinativos mostraron un incremento muy marcado en función del aumento de la concentración del fungicida en el medio. Para este fungicida, la pérdida de sensibilidad en las poblaciones de LR y PAL fue muy similar. En la concentración de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$, el porcentaje de inhibición en la población silvestre (SC) fue de 62,8%, en LR de 50,2% y en PAL de 54,4% mostrando leves diferencias con respecto a la población silvestre, no obstante, para la concentración de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ la pérdida de sensibilidad aumentó; la población silvestre (SC) se inhibió en un 87,0%, en LR 55,7% y en PAL 59,7%, con 31,3% y 27,3% menos de inhibición para LR y PAL, respectivamente. La diferencia entre los valores de CE_{50} de las poblaciones de LR y PAL fue mínima y la pérdida de sensibilidad muy similar en ambas poblaciones (Cuadro 7).

Para el pirimetanil la sensibilidad de la población silvestre (SC) fue muy similar a la población presente en LR. En la concentración de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ el porcentaje de inhibición de la población silvestre fue de 60,9%, en LR de 64,6% y en PAL de 47,1% presentándose en la última una disminución de 13,8% con respecto a la población silvestre e indicando la pérdida de sensibilidad a este compuesto. Para la concentración de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ la población silvestre mostró un 67,8% de inhibición, en LR un 75,7% y en PAL un 52,2%, mostrándose igualmente la pérdida de sensibilidad en PAL y una superioridad en sensibilidad de 8% de la población de LR con respecto a la población silvestre. La CE_{50} solo pudo ser determinada con certeza para la población de PAL ($CE_{50} = 0,103 \text{ mg L}^{-1}$) y en LR y SC fue $< 0,001 \text{ mg L}^{-1}$ (Cuadro 7).

Cuadro 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, obtenidos de la evaluación *in vitro* de diferentes fungicidas sistémicos en tres poblaciones del patógeno: Santa Clara, La Rita y Palacios.

Fungicida	Santa Clara (SC)					La Rita (LR)					Palacios (PAL)				
	Concentración del Fungicida (mg L ⁻¹)					Concentración del Fungicida (mg L ⁻¹)					Concentración del Fungicida (mg L ⁻¹)				
	0,001	0,01	0,1	1	10	0,001	0,01	0,1	1	10	0,001	0,01	0,1	1	10
Propiconazole	63,0	69,2	73,4	81,8	94,3	47,4	53,4	60,5	66,0	82,2	52,3	53,4	58,6	86,9	91,2
Dif. población silvestre ¹						15,6	15,8	13,0	15,8	12,1	10,6	15,8	14,8	-5,1	3,0
Difenoconazole	45,5	71,1	72,5	76,9	94,0	34,5	37,6	63,8	68,6	77,3	54,2	58,5	62,4	75,5	90,1
Dif. población silvestre ¹						10,9	33,5	8,7	8,3	16,6	-8,8	12,6	10,1	1,4	3,9
Epoxiconazole	45,0	47,9	67,4	75,6	79,5	26,6	47,7	63,6	68,2	82,8	52,8	61,5	75,0	86,6	91,7
Dif. población silvestre ¹						18,5	0,2	3,7	7,5	-3,3	-7,7	-13,6	-7,6	-11,0	-12,2
Tridemorph	36,5	55,0	70,1	76,6	88,3	41,2	63,8	64,6	76,9	91,4	43,9	53,5	58,8	67,7	91,5
Dif. población silvestre ¹						-4,8	-8,9	5,5	-0,3	-3,1	-7,4	1,5	11,3	8,9	-3,2
Spiroxamina	71,7	77,7	78,0	91,3	92,0	44,0	69,9	74,7	77,3	87,0	48,9	35,7	52,8	57,3	82,5
Dif. población silvestre ¹						27,6	7,8	3,4	14,0	5,0	22,7	42,0	25,2	34,0	9,5
Fenpropimorph	73,9	100,0	93,5	81,9	88,1	62,2	69,9	74,4	73,8	76,3	48,1	78,4	77,8	81,0	89,1
Dif. población silvestre ¹						11,6	30,1	19,2	8,1	11,8	25,8	21,6	15,7	0,8	-1,0
Pyraclostrobin	81,9	90,3	93,4	86,7	92,4	65,7	84,4	75,4	84,6	100,0	58,1	68,4	58,5	64,8	90,0
Dif. población silvestre ¹						16,2	6,0	18,0	2,1	-7,6	23,8	21,9	34,9	21,8	2,5
Boscalid	79,4	83,0	80,2	84,9	89,4	18,5	49,3	63,2	61,8	77,3	67,6	67,8	74,0	80,2	89,6
Dif. población silvestre ¹						61,0	33,7	17,0	23,1	12,1	11,8	15,2	6,3	4,7	-0,2
Metil tiofanato	30,9	62,8	87,0	84,9	92,1	41,5	50,2	55,7	68,3	75,0	33,0	54,4	59,7	72,0	79,3
Dif. población silvestre ¹						-10,6	12,7	31,3	16,5	17,2	-2,1	8,4	27,3	12,9	12,8
Pirymetaniil	55,6	60,9	67,8	76,3	92,7	55,8	64,6	75,7	75,9	79,2	37,5	47,1	52,2	51,7	61,2
Dif. población silvestre ¹						-0,2	-3,7	-7,9	0,4	13,5	18,0	13,8	15,6	24,6	31,5
Dietofencarb	33,3	54,5	67,6	77,5	81,0	28,0	38,4	55,2	75,9	82,9	34,9	34,8	56,5	73,1	80,9
Dif. población silvestre ¹						5,3	16,0	12,4	1,7	-1,9	-1,6	19,7	11,0	4,5	0,0

1/Diferencia entre los porcentajes de inhibición de las poblaciones de LR y PAL con respecto a la población silvestre (SC).

Por último, el dietofencarb mostró niveles de pérdida de sensibilidad muy similares en las poblaciones de LR y PAL. En la concentración de 0,01 mg L⁻¹ el porcentaje de inhibición en la población silvestre fue de 54,5%, en LR de 38,4 y en PAL de 34,8% presentándose pocas diferencias entre las poblaciones de LR y PAL, pero mayores con la población silvestre, indicando una leve pérdida de sensibilidad a este compuesto. Para la concentración de 0,1 mg L⁻¹ la sensibilidad aumentó, inhibiendo 67,6% en SC, 55,2% en LR y 56,5% en PAL. Cuando se incrementó la concentración de fungicida en el medio (10,0 mg L⁻¹) las tres poblaciones mostraron el mismo nivel de sensibilidad a este compuesto. Con respecto a las CE₅₀, el valor mayor fue encontrado en la población de LR, seguido por la población de PAL (Cuadro 7).

Cuadro 7. Valores de Concentración efectiva media (CE₅₀) obtenidos para cada fungicida utilizado en las tres poblaciones estudiadas.

Tratamiento	Santa Clara (SC)	La Rita (LR)	Palacios (PAL)
	CE ₅₀ (mg L ⁻¹)	CE ₅₀ (mg L ⁻¹)	CE ₅₀ (mg L ⁻¹)
Propiconazole	<0,001	0,0035	0,002
Difenoconazole	<0,001	0,0283	<0,001
Epoxiconazole	0,004	0,026	<0,001
Tridemorph	<0,001	0,0028	0,006
Spiroxamina	<0,001	<0,001	0,024
Fenpropimorph	<0,001	<0,001	<0,001
Pyraclostrobin	<0,001	<0,001	<0,001
Boscalid	<0,001	0,05	<0,001
Metil tiofanato	0,002	0,0126	0,0135
Pirymetanol	<0,001	<0,001	0,103
Dietofencarb	0,007	0,04	0,035
Promedio	0,002	0,0116	0,017
FR prom ¹		5,8	8,5

FR= Factor de resistencia promedio= CE₅₀ promedio LR o PAL/ CE₅₀ silvestre (SC)

4.2. Etapa II. Aplicación y evaluación de los tratamientos de fungicidas a nivel de campo

4.2.1. Determinación del volumen de mezcla aplicado en los tratamientos de fungicidas en el campo.

En la Figura 8, se muestran las pruebas preliminares realizadas sobre trozos de papel bond de 80 cm². En las pruebas realizadas con un volumen total de aplicación de 250 L ha⁻¹ se tomó una alícuota de 0,2 ml, en este caso el área por aplicar cercana a las paredes de la torre quedaban poco provista de cobertura (Figura 8A), por lo que se podía limitar el efecto del fungicida. Sin embargo, cuando se realizaron las pruebas para un volumen total de 350 L ha⁻¹, tomando una alícuota de 0,28 ml, se observó una mejor cobertura del área aplicada. En la Figura 8B, se puede observar como en la parte del centro queda una mayor concentración del volumen aplicado, no obstante, en las áreas cercanas a las paredes de la torre se nota una película de gotas más finas, que garantizaba una cobertura total del área de aplicación. Considerando este aspecto se tomó este volumen como referencia para la aplicación de los fungicidas en el campo.

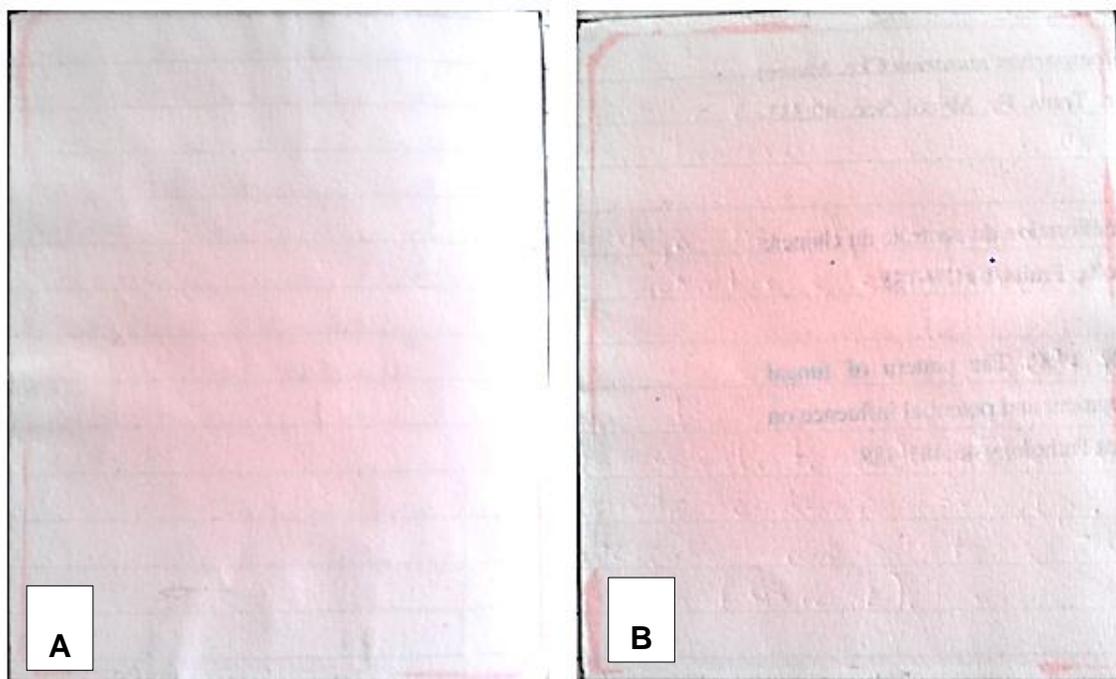


Figura 8. Pruebas preliminares para la determinación del volumen a aplicar en la fase de campo. **(A)** Aplicación de 0,2 ml/80 cm², volumen total de 250 L ha⁻¹. **(B)** Aplicación de 0,28 ml/80 cm², volumen total de 350 L ha⁻¹. Murillo, 2015.

4.2.2. Resultados obtenidos en las pruebas de aplicaciones de los fungicidas en el campo

Los resultados obtenidos de la aplicación de tratamientos en el campo, se resumen seguidamente. Las variables evaluadas fueron el Periodo de incubación (PI), Periodo en presentar el estadio 4 de los síntomas de la enfermedad (PE4), Periodo de latencia (PL), la severidad de la enfermedad (% de área necrosada) y la eficacia de los fungicidas (%), evaluados en diferentes días post-infección.

4.2.2.1. Periodos de Incubación (PI)

4.2.2.1.1. PI Santa Clara

Los periodos de incubación presentados por los tratamientos aplicados en la parcela experimental de Santa Clara, se muestran en el Cuadro 8. El PI más corto fue presentado por el testigo absoluto (T13; 18,0 días) y el más extenso por el

pyraclostrobin (T7; 21,1 días). El análisis de la varianza encontró diferencias entre los tratamientos ($P= 0,0036$). De esta manera, con los contrastes realizados (Cuadro 9) se evidenciaron diferencias entre triazoles (T1, T2 y T3) y la estrobilurina (T7; $P= 0,0132$) con un mejor efecto (PI más prolongado) por parte del pyraclostrobin (T7) que presentó un PI de 21,1 días, mientras que los triazoles tardaron en promedio 19,9 días. Estos también presentaron diferencias con el benzimidazol (T9; $P= 0,0119$) que presentó un PI de 18,8 días, con la anilino pirimidina (T10; $P= 0,0254$) 18,9 días, el N- fenil carbamato (T11; $P= 0,0473$) con 19,0 días y con 10% de significancia se presentaron ligeras diferencias con el grupo de las aminas (T4, T5 y T6; $P= 0,0669$) que presentaron en promedio 19,4 días y con el aceite ($P= 0,0633$) que tardó 19,1 días en presentar los síntomas iniciales. Por otra parte el grupo de las aminas mostró diferencias con respecto a la estrobilurina ($P= 0,0002$), con un mejor efecto mostrado por el pyraclostrobin (T7) que fue el tratamiento con el mejor efecto en esta variable. Además, según los resultados de la prueba de separación de medias, únicamente los tratamientos correspondientes al pyraclostrobin (T7) y al difenoconazole (T2) superaron el efecto del aceite o testigo relativo (T12; $P\leq 0,0561$).

Por otra parte, el análisis de varianza también evidenció un efecto causado por los diferentes DPI ($P< 0,0001$), donde los tratamientos aplicados a los 8 DPI mostraron en promedio el mejor efecto con 20,6 días en cumplir este periodo, seguido de los aplicados a los 12 DPI con 19,5 y por último los aplicados a los 16 DPI con 18,5 días, lo que se puede apreciar en la Figura 9. No se encontró efecto de interacción entre los tratamientos y los DPI ($P= 0,2924$), mientras que los diferentes estados de apertura de la hoja si mostraron un efecto significativo ($P< 0,0001$). Así los tratamientos aplicados en plantas con candelas de menor desarrollo (grados 0-6) según escala de Brun (1963), en general mostraron mejor efecto que los aplicados en candelas con grado 8.

Mediante una prueba de T de Student se comparó el efecto del testigo relativo (aceite) con el testigo absoluto (sin aplicación), y no se encontraron diferencias entre estos tratamientos para esta variable ($P= 0,6198$).

4.2.2.1.2. PI La Rita

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 10. El análisis de varianza no evidenció diferencias en el PI de los diferentes tratamientos ($P= 0,5259$) de esta parcela, siendo el periodo más corto de 22,2 días presentado por el testigo absoluto (T13) y el mayor de 24,4 días por el pyraclostrobin (T7). Estos resultados fueron comprobados de igual forma mediante pruebas de contrastes (Cuadro 11), en los cuales no se presentaron diferencias entre ninguno de los tratamientos ($P \geq 0,1058$). La prueba de separación de medias solo encontró que el pyraclostrobin (T7) presentó un PI mayor que el testigo relativo (aceite; $P= 0,0455$), al igual que el fenpropimorph (T6) con 10% de significancia ($P= 0,0820$), los demás tratamientos no fueron estadísticamente diferentes al tratamiento testigo.

No se presentó efecto de interacción entre los tratamientos y los DPI ($P= 0,2564$). Sin embargo, los diferentes DPI si mostraron efecto sobre esta variable ($P < 0,0001$) donde los tratamientos aplicados a los 8 DPI fueron los que mostraron en promedio un mayor PI con 24,7 días seguidos por 23,6 y 22,3 días para 12 y 16 DPI respectivamente, lo que se puede observar claramente en la Figura 9. Por otra parte se detectó un efecto sobre los tratamientos debido al estado de desarrollo de la hoja candela donde fueron aplicados los diferentes fungicidas ($P=0.0016$). Este efecto es difícil de observar debido a la alta variabilidad de los datos y el efecto de los diferentes fungicidas, sin embargo, el PI fue más prolongado en la mayoría de los casos, en los tratamientos aplicados en candelas con grados 0-6 según escala de Brun (1963). Además, la prueba de T de Student no mostró diferencias entre el testigo relativo (aceite) y el testigo absoluto para esta variable ($P= 0,7040$).

4.2.2.1.3. PI Palacios

Los periodos de incubación presentados por los tratamientos aplicados en la parcela experimental de finca Palacios se muestran en el Cuadro 12. El PI más corto fue presentado por la anilinopirimidina (T10; 22,5 días) y el más extenso por la spiroxamina (T5; 25,9 días). El análisis de la varianza no detectó diferencias en el efecto de los tratamientos ($P= 0,5609$), comprobado de igual forma por medio de contrastes (Cuadro 13), donde únicamente se detectó una leve diferencia con 10% de significancia entre las aminas (T4, T5, T6) y la anilinopirimidina (T10). Las aminas tuvieron un mejor efecto, en promedio presentaron un PI de 24,5 días, mientras que la anilinopirimidina (T10) presentó el PI más corto (22,5 días), inclusive menor al testigo relativo cuyo PI fue de 23,8 días.

El análisis de varianza tampoco evidenció efecto de los DPI ($P= 0,3247$) (Figura 9), ni de la interacción entre los tratamientos y los DPI ($P= 0,7944$). No obstante, se detectaron diferencias causadas por los diferentes estados de desarrollo de las candelas donde fueron aplicados los tratamientos ($P < 0,0001$), de esta manera, en general, los PI más extensos fueron presentados por los tratamientos aplicados en candelas con grados de apertura entre 0 y 6. Además, mediante la prueba de T de Student realizada para comparar el efecto del aceite o testigo relativo (T12) y absoluto (T13), no se encontraron diferencias en este periodo ($P= 0,4962$).

Cuadro 8. Periodos de incubación (PI), Periodos en alcanzar el estadio 4 de síntomas (PE4) y Periodos de latencia (PL) observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en la parcela experimental de Santa Clara. CORBANA, 2015.

Tratamiento ¹	PI (días)				PE4 (días)				P. L (días)			
	Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación			
	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.
T1	21,8	19,8	18,0	19,9	32,4	32,0	28,2	30,9	39,8	38,8	35,2	37,9
T2	21,6	20,2	18,6	20,2	32,6	31,4	29,4	31,1	41,6	42	39,0	40,9
T3	20,8	19,8	18,8	19,8	29,6	32,6	27,0	29,7	36,2	39,2	36,6	37,3
T4	19,8	18,6	18,8	19,1	28,0	27,6	28,0	27,9	36,2	34,2	35,6	35,3
T5	19,6	19,4	19,2	19,4	27,0	28,4	26,4	27,3	32,8	34,6	34,6	34,0
T6	20,4	20,4	18,0	19,6	31,2	30,6	26,6	29,5	37,6	36,6	32,8	35,7
T7	23,4	21,4	18,4	21,1	33,4	29,8	28,4	30,5	41,6	37,2	37,6	38,8
T8	20,8	19,2	18,6	19,5	31,0	27,0	27,6	28,5	37,2	33,8	33,2	34,7
T9	19,6	18,6	18,0	18,7	27,2	27,0	26,4	26,9	33,8	33,8	33,4	33,7
T10	19,2	19,4	18,0	18,9	26,8	27,2	27,8	27,3	33,0	35	35,0	34,3
T11	19,8	18,6	19,0	19,1	29,2	26,6	27,2	27,7	35,4	32,4	33,8	33,9
T12	20,4	18,8	18,6	19,3	28,0	27	28,2	27,7	35,0	31,4	33,4	33,3
T13	18,0			18,0	26,6			26,6	32,4			32,4
				P> F				P> F				P> F
Tratamiento				0,0036				0,0006				<0,0001
DPI				<0,0001				0,0036				0,0628
Trat*DPI				0,2924				0,5128				0,5850
Candela				<0,0001				<0,0001				<0,0001

1/T1= Propiconazole, T2= Difenconazole, T3= Epoxiconazole, T4= Tridemorph, T5= Spiroxamina, T6= Fenpropimorph, T7= Pyraclostrobin, T8= Boscalid, T9= Metil tiofanato, T10= Pirymetaniil, T11= Dietofencarb, T12= Testigo relativo (aceite), T13= Testigo absoluto.

Cuadro 9. Pruebas de contrastes realizados entre los diferentes tratamientos aplicados en la parcela experimental de Santa Clara, para las variables PI, PE4 y PL. CORBANA, 2015.

Contrastes	PI	PE4	P. L	
Entre triazoles	P> F	0.7652	0.4314	0.0243
Entre aminas	P> F	0.7179	0.1894	0.4362
Triazoles vs aminas	P> F	0.0669	0.0009	<.0001
Triazoles vs estrobilurina	P> F	0.0132	0.9897	0.9190
Triazoles vs carboxamida	P> F	0.4173	0.0462	0.0007
Triazoles vs benzimidazol	P> F	0.0119	0.0003	<.0001
Triazoles vs anilino pirimidina	P> F	0.0254	0.0013	0.0002
Triazoles vs n- fenil carbamato	P> F	0.0473	0.0026	<.0001
Triazoles vs testigo (aceite)	P> F	0.0633	0.0024	<.0001
Aminas vs estrobilurina	P> F	0.0002	0.0180	0.0009
Aminas vs carboxamida	P> F	0.6233	0.6927	0.8513
Aminas vs benzimidazol	P> F	0.2164	0.2065	0.2615
Aminas vs anilino pirimidina	P> F	0.3423	0.3861	0.5900
Aminas vs N- fenil carbamato	P> F	0.4879	0.5111	0.2765
Aminas vs testigo (aceite)	P> F	0.5719	0.4936	0.0931

Cuadro 10. Periodos de incubación (PI), Periodos en alcanzar el estadio 4 de síntomas (PE4) y Periodos de latencia (PL) observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en los diferentes DPI en la parcela experimental de La Rita. CORBANA, 2015.

Tratamiento	PI (días)				PE4 (días)				PL (días)			
	Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación			
	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.
T1	24,6	23,8	23,4	23,9	27,8	27,6	27,6	27,7	31,6	31,0	31,2	31,3
T2	25,0	21,4	22,4	22,9	31,8	27,2	27,8	28,9	35,2	29,8	30,4	31,8
T3	23,0	24,4	21,4	22,9	26,2	28,2	25,0	26,5	29,8	32,0	30,8	30,9
T4	25,4	23,4	22,2	23,7	28,6	27,6	25,6	27,3	32,8	31,4	30,8	31,7
T5	25,4	23,8	20,6	23,3	28,0	27,6	25,0	26,9	32,0	30,8	29,8	30,9
T6	23,0	25,4	24,2	24,2	26,6	28,4	27,0	27,3	29,4	30,0	30,0	29,8
T7	26,8	24,6	21,8	24,4	29,8	29,4	26,0	28,4	32,8	33,6	29,8	32,1
T8	25,4	23,6	23,0	24,0	30,0	27,2	28,2	28,5	34,0	30,8	31,0	31,9
T9	23,0	23,4	22,6	23,0	27,6	27,4	26,4	27,1	31,2	29,8	30,8	30,6
T10	25,2	23,8	22,2	23,7	28,6	26,8	25,6	27,0	33,0	29,6	30,2	30,9
T11	25,4	23,2	22,6	23,7	29,6	27,0	26,8	27,8	31,8	32,0	30,8	31,5
T12	23,4	22,6	22,2	22,7	26,8	25,8	25,0	25,9	32,0	30,4	30,0	30,8
T13	22,2			22,2	25,8			25,8	30,0			30,0

	P > F	P > F	P > F
Tratamiento	0,5259	0,0532	0,5384
DPI	<0,0001	<0,0001	0,0015
Trat*DPI	0,2564	0,4748	0,4852
Candela	0,0016	0,0019	0,0364

1/T1= Propiconazole, T2= Difenconazole, T3= Epoxiconazole, T4= Tridemorph, T5= Spiroxamina, T6= Fenpropimorph, T7= Pyraclostrobin, T8= Boscalid, T9= Metil tiofanato, T10= Pirymetamil, T11= Dietofencarb, T12= Testigo relativo (aceite), T13= Testigo absoluto.

Cuadro 11. Pruebas de contrastes realizados entre los diferentes tratamientos aplicados en la parcela experimental de La Rita para variables PI, PE4 y PL. CORBANA, 2015.

Contrastes	Probabilidad	PI	PE4	P. L
Entre triazoles	P > F	0.3180	0.0359	0.6775
Entre aminas	P > F	0.5091	0.7754	0.1407
Triazoles vs aminas	P > F	0.3682	0.3133	0.3508
Triazoles vs estrobilurina	P > F	0.1058	0.3416	0.3499
Triazoles vs carboxamida	P > F	0.3122	0.3165	0.4564
Triazoles vs benzimidazol	P > F	0.7023	0.4573	0.3789
Triazoles vs anilino pirimidina	P > F	0.4795	0.3771	0.6582
Triazoles vs n- fenil carbamato	P > F	0.5547	0.9422	0.8225
Triazoles vs testigo (aceite)	P > F	0.4004	0.0128	0.4944
Aminas vs estrobilurina	P > F	0.3242	0.0972	0.1119
Aminas vs carboxamida	P > F	0.7075	0.0875	0.1611
Aminas vs benzimidazol	P > F	0.3089	0.9763	0.8257
Aminas vs anilino pirimidina	P > F	0.9437	0.8649	0.8273
Aminas vs N- fenil carbamato	P > F	0.9635	0.4320	0.3768
Aminas vs testigo (aceite)	P > F	0.1407	0.0731	0.9814

Cuadro 12. Periodos de incubación (PI), Periodos en alcanzar el estadio 4 de síntomas (PE4) y Periodos de latencia (PL) observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en los diferentes DPI en la parcela experimental de finca Palacios. CORBANA, 2015.

Tratamiento	PI (días)				PE4 (días)				PL (días)			
	Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación			
	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.
T1	22,4	24,2	25,2	23,9	33,4	35,0	36,8	35,1	35,6	37,8	39,6	37,7
T2	23,6	24,6	24,8	24,3	33,0	32,8	34,2	33,3	35,8	37,0	38,4	37,1
T3	24,2	24,0	23,8	24,0	32,6	35,4	32,4	33,5	35,2	38,4	35,6	36,4
T4	26,2	24,6	21,8	24,2	32,4	33,4	29,6	31,8	36,6	37,2	33,2	35,7
T5	24,6	24,6	28,4	25,9	34,8	33,6	37,2	35,2	38,6	38,4	39,2	38,7
T6	25,0	22,0	22,8	23,3	33,8	32,8	34,0	33,5	37,8	39,4	38,4	38,5
T7	24,6	24,2	22,8	23,9	33,4	33,0	34,2	33,5	37,6	36,4	37,6	37,2
T8	23,4	24,0	22,8	23,4	32,8	34,6	31,8	33,1	35,8	37,2	35,8	36,3
T9	26,2	23,8	23,4	24,5	36,4	36,8	31,4	34,9	39,0	33,6	33,8	35,5
T10	23,2	22,0	22,4	22,5	31,8	31,8	32,0	31,9	34,8	35,2	35,8	35,3
T11	26,4	22,8	22,8	24,0	29,4	31,6	32,4	31,1	38,6	35,2	36,4	36,7
T12	23,8	23,0	22,8	23,2	31,8	32,6	32,8	32,4	35,0	35,2	35,8	35,3
T13	24,2			24,2	35,0			35,0	39,2			39,2
				P> F				P> F				P> F
Tratamiento				0,5609				0,2787				0,1444
DPI				0,3247				0,7393				0,9859
Trat*DPI				0,7944				0,9272				0,7035
Candela				<0,0001				<0,0001				<0,0001

1/T1= Propiconazole, T2= Difenconazole, T3= Epxiconazole, T4= Tridemorph, T5= Spiroxamina, T6= Fenpropimorph, T7= Pyraclostrobin, T8= Boscalid, T9= Metil tiofanato, T10= Pirymetamil, T11= Dietofencarb, T12= Testigo relativo (aceite), T13= Testigo absoluto.

Cuadro 13. Pruebas de contrastes realizados entre los diferentes tratamientos aplicados en la parcela experimental de Finca Palacios, para las variables PI, PE4 y PL. CORBANA, 2014.

Contrastes		PI	PE4	P. L
Entre triazoles	P> F	0.8946	0.6194	0.7784
Entre aminas	P> F	0.1249	0.1167	0.0378
Triazoles vs aminas	P> F	0.5934	0.6727	0.4315
Triazoles vs estrobilurina	P> F	0.7809	0.7214	0.9357
Triazoles vs carboxamida	P> F	0.5826	0.5838	0.5672
Triazoles vs benzimidazol	P> F	0.6235	0.4466	0.2028
Triazoles vs anilino pirimidina	P> F	0.1383	0.1362	0.1255
Triazoles vs n- fenil carbamato	P> F	0.9716	0.0521	0.8718
Triazoles vs testigo (aceite)	P> F	0.3537	0.2385	0.1194
Aminas vs estrobilurina	P> F	0.5123	0.9538	0.6341
Aminas vs carboxamida	P> F	0.3543	0.8031	0.2598
Aminas vs benzimidazol	P> F	0.9096	0.2898	0.0682
Aminas vs anilino pirimidina	P> F	0.0637	0.2325	0.0376
Aminas vs N- fenil carbamato	P> F	0.7324	0.0992	0.4730
Aminas vs testigo (aceite)	P> F	0.1927	0.3780	0.0354

4.2.2.2. Periodos en presentar el estadio 4 de los síntomas de la enfermedad (PE4)

4.2.2.2.1. PE4 Santa Clara

Los resultados de esta variable y el análisis de varianza se muestran en el Cuadro 8. El PE4 más corto fue presentado por el testigo absoluto (T13; 26,6 días) y el más extenso por el difenoconazole (T2; 31,1 días). Se encontraron diferencias entre el efecto de los tratamientos ($P= 0,0006$), confirmado de igual forma con los contrastes realizados (Cuadro 9). Estos evidenciaron diferencias entre los triazoles (T1, T2 y T3) y las aminas (T4, T5 y T6) ($P= 0,0009$) con mejor efecto por parte de los triazoles al tardar mayor número de días en presentar el PE4, con 30,6 días y 28,2 días, respectivamente. Los triazoles además mostraron un mejor efecto que la carboxamida (T8; $P= 0,0462$) que tardó 28,6 días en alcanzar este periodo, con el benzimidazol (T9; $P= 0,0003$) que tardó 26,9 días, con la anilino pirimidina (T10; $P= 0,0013$) que tardó 27,3 días, con el fenil carbamato (T11; $P= 0,0026$) que tardó 27,5 días y con el testigo relativo (T12; $P= 0,0024$) que tardó 27,5 días. Por otra parte las aminas presentaron también un efecto menor a la estrobilurina (T7; $P= 0,0180$), esta última tardó 30,6 días en alcanzar dicho periodo. Además, con la prueba de separación de medias se determinó que solo el propiconazole (T1), difenoconazole (T2), pyraclostrobin (T7) ($P\leq 0,0130$) y el epoxiconazole (T3; $P= 0,0763$) con 10% de significancia superaron el efecto del testigo relativo (T12).

El análisis de varianza detectó un efecto causado por los DPI ($P= 0,0036$) donde los tratamientos aplicados a los 8 DPI fueron los que mostraron en promedio los PE4 más prolongados (29,7 días), los cuales no difieren con los aplicados a los 12 DPI ($P= 0,2130$; 28,9 días), pero si de los aplicados a los 16 DPI (27,6 días), con probabilidades de ($P= 0,0009$) y ($P= 0,0343$) para 8 y 12 DPI respectivamente (Figura 10). No se encontró efecto de interacción entre los tratamientos y DPI ($P=0,5128$), pero los diferentes estados de apertura de la candela si demostraron efecto sobre los tratamientos ($P< 0,0001$). Esto último indica que los tratamientos aplicados en candelas con estados de apertura entre 0

y 6 fueron los que presentaron los PE4 más prolongados en comparación con los aplicados en candelas con grado 8.

Por otra parte, mediante una prueba de T de Student se comparó el efecto del testigo relativo (aceite) con el testigo absoluto, sin encontrar diferencias entre estos tratamientos para esta variable ($P= 0,8340$).

4.2.2.2. PE4 La Rita

En esta población, el PE4 más corto fue presentado por el testigo absoluto (T13; 25,8 días) y el más extenso por el difenoconazole (T2; 28,9 días). Los resultados de esta variable y el análisis de varianza se presentan en el Cuadro 10. Se encontraron diferencias entre los tratamientos ($P= 0,0532$) y según la prueba de contrastes (Cuadro 11) se encontraron diferencias entre los triazoles (T1, T2, T3; $P= 0.0359$), donde el PE4 fue mayor para el difenoconazole (T2) que tardó 28,9 días, seguido por el propiconazole (T1) que tardó 27,7 días sin diferencias entre sí, pero significativamente mayor al epoxiconazole (T3) que tardó 26,5 días, además en promedio los triazoles también superaron el efecto del testigo relativo (T12; $P= 0,0128$). También se encontraron diferencias con 10% de significancia según la prueba de contrastes entre los tratamientos correspondientes al grupo de las aminas (T4, T5, T6) que tardaron 27,2 días en presentar este periodo con la estrobilurina (T7; $P= 0,0972$) con el mayor PE4 presentado por el T7, que tardó 28,4 días, entre aminas y carboxamida (T8; $P=0.0875$) con mejor efecto del T8 (28,5 días) y entre aminas con el testigo relativo (T12; 25,9 días) siendo mayor el efecto de las aminas ($P= 0,0731$). Con la prueba de separación de medias se encontró que los tratamientos correspondientes al propiconazole (T1), difenoconazole (T2), dietofencarb (T11), pyraclostrobin (T7) y boscalid (T8) presentaron un PE4 mayor al testigo (T12; $P\leq 0,0359$) al igual que el tridemorph (T4) con 10% de significancia ($P= 0,0880$).

El análisis de la varianza encontró diferencias debidas al efecto de los diferentes DPI ($P < 0,0001$). Así los tratamientos aplicados a los 8 DPI mostraron en promedio el PE4 más prolongado con 28,5 días, 27,5 días para 12 DPI y 26,3

días para 16 DPI, siendo todos diferentes ($P < 0,0196$). En la Figura 10, se puede notar que el periodo varía en los diferentes DPI, pero claramente se ve como en la mayoría de los tratamientos de 8 DPI el periodo fue más prolongado y en promedio superó a los tratamientos de 12 y 16 DPI.

Al igual que en la variable PI no se mostró efecto de interacción entre los tratamientos y los DPI ($P = 0,4748$), pero si un efecto significativo debido al estado de la candela ($P = 0,0019$). Además, la prueba de T de Student realizada para comparar el efecto del testigo relativo (T12) y absoluto (T13), sobre el PE4 no mostró diferencias entre estos tratamientos ($P = 0,5375$).

4.2.2.2.3. PE4 Palacios

Los resultados obtenidos para esta variable se muestran en el Cuadro 12. El PE4 más corto se observó en el dietofencarb (T11; 31,1 días) y el más extenso por la spiroxamina (T5; 35,2 días). Para esta variable, el análisis de varianza no detectó diferencias en los PE4 presentados por los diferentes tratamientos ($P = 0,2787$). No obstante, mediante pruebas de contrastes (Cuadro 13), se detectaron diferencias entre los triazoles (T1, T2, T3) que tardaron 34,0 días en presentar este periodo y el N- fenil carbamato ($P = 0,0521$) que prentó el PE4 más corto en esta población, con mejor efecto por parte de los triazoles y con 10% de significancia entre las aminas (T4, T5, T6) y el N- fenil carbamato ($P = 0,0992$). En este caso las aminas presentaron periodos un poco más extensos. Mediante la prueba de separación de medias, se determinó que ningún tratamiento mostró diferencias con el testigo relativo ($P \geq 0,1142$), solamente la spiroxamina (T5), fue levemente mayor con 10% de significancia ($P = 0,0863$).

Por otra parte, el análisis de varianza no detectó diferencias causadas por efecto de los DPI ($P = 0,7393$; Figura 10), ni por la interacción de los tratamientos y los DPI ($P = 0,9272$). Sin embargo, se detectaron diferencias debidas al estado de desarrollo de la hoja candela ($P < 0,0001$). Además, con la prueba de T de Student realizada para comparar el efecto del testigo relativo (T12) y absoluto (T13), no se encontraron diferencias entre los mismos ($P = 0,9934$).

4.2.2.3. Periodos de Latencia (PL)

4.2.2.3.1. PL Santa Clara

Los resultados de esta variable se presentan en el Cuadro 8. El PL más corto fue observado en el testigo absoluto (T13; 32,4 días) y el más extenso en el difenoconazole (T2; 40,9 días). El análisis de la varianza arrojó diferencias en el efecto de los tratamientos ($P < 0,0001$), comprobado además mediante pruebas de contrastes (Cuadro 9), con los cuales se encontraron diferencias entre los triazoles (T1, T2 y T3; $P = 0,0243$), donde el difenoconazole (T2) presentó el PL más prolongado de ellos y de todos los tratamientos con 40,9 días, seguido del propiconazole (T1) que tardó 37,9 días y el epoxiconazole (T3) con 37,3 días. De igual forma se encontraron diferencias entre los triazoles y las aminas (T4, T5 y T6; $P < 0,0001$) con mejor efecto por parte de los primeros, los cuales presentaron en promedio un PL de 38,7 días contra 34,9 días por parte de las aminas. Los triazoles también superaron el efecto de la carboxamida (T8), benzimidazol (T9), anilopirimidina (T10), N-fenil carbamato (T11) y el testigo relativo (T12; $P \leq 0,0007$) al presentar periodos de latencia más extensos. Las pruebas de contrastes mostraron diferencias entre las aminas y la estrobilurina (T7; $P = 0,0009$), siendo el T7 el que mostró mejor efecto (38,8 días). Mediante la prueba de separación de medias se encontró que el testigo relativo (T12), solo fue superado por el propiconazole (T1), difenoconazole (T2), epoxiconazole (T3) y pyraclostrobin (T7; $P \leq 0,0028$).

Para esta variable no se presentaron diferencias entre los diferentes DPI ($P = 0,0628$), sin embargo, los tratamientos aplicados a los 8 DPI presentaron periodos de latencia ligeramente más extensos (Figura 11). No se presentó efecto de interacción entre los tratamientos y los DPI ($P = 0,5850$), pero si debido a los diferentes estados de candela donde se aplicaron los tratamientos ($P < 0,0001$). Por otra parte, mediante una prueba de T de Student se comparó el efecto del testigo relativo (aceite) con el testigo absoluto y no encontraron diferencias entre estos tratamientos ($P = 0,6595$).

4.2.2.3.2. PL La Rita

Los resultados de esta variable se pueden observar en el Cuadro 10. El PL más corto fue presentado por el fenpropimorph (T6; 29,8 días) y el más extenso por el pyraclostrobin (T7; 32,1 días). El análisis de varianza no detectó diferencias causadas por efecto de los tratamientos ($P= 0,5384$), lo que se muestra de igual forma en la prueba de contrastes (Cuadro 11; $P \geq 0,1119$). Además, la prueba de separación de medias demostró que todos los tratamientos presentaron periodos de latencia estadísticamente iguales al testigo ($P \geq 0,1873$).

Se presentaron diferencias debidas al efecto de los diferentes DPI ($P= 0,0015$) donde los tratamientos aplicados a los 8 DPI tuvieron en promedio los mayores valores (32,2 días). Estos difieren con los PL presentados a los 12 y 16 DPI ($P \leq 0,0093$), que tardaron 30,9 y 30,4 días respectivamente, no obstante, entre los tratamientos aplicados a los 12 y 16 DPI no se detectaron diferencias ($P=0.3565$). En la Figura 11 se puede observar, como en la mayoría de los tratamientos se destaca levemente el efecto mostrado por las aplicaciones de 8 DPI, mientras que los tratamientos de 12 y 16 DPI no sobresalen unos sobre otros. No se presentó interacción entre los tratamientos y los DPI ($P= 0,4852$) y se detectaron diferencias provocadas por los diferentes estados de desarrollo de la candela ($P= 0,0364$). Mediante una prueba de T de Student se encontró que el PL fue diferente ($P < 0,0001$) y mayor por parte del testigo relativo (T12), superando al testigo absoluto (T13) por 2 días en las aplicaciones de 8 DPI, sin diferencias entre 12 y 16 DPI.

4.2.2.3.3. PL Palacios

Los resultados de esta variable se muestran en el Cuadro 12. El PL más corto fue presentado por la anilinopirimidina (T10) y el testigo relativo (T12; 35,3 días) y el más extenso por el testigo absoluto (T13; 39,2 días). El análisis de la varianza no detectó diferencias debido al efecto de los tratamientos ($P= 0,1444$), sin embargo, los contrastes realizados (Cuadro 13) si lograron detectar algunas diferencias. De esta manera, se encontraron diferencias entre los tratamientos de aminas (T4, T5, T6; $P= 0,0378$), así la spiroxamina (T5) y el fenpropimorph (T6) no

presentaron diferencias entre sí ($P= 0,9403$) con periodos de 38,7 y 38,6 días respectivamente, pero ambos mostraron mejor efecto que el tridemorph (T4) ($P\leq 0,0291$) con un PL de 35,6 días. Además, se encontraron diferencias entre las aminas y la anilino pirimidina (T10; $P= 0,0376$) y con el testigo relativo (T12; $P= 0,0354$) en ambos casos con mejor efecto por parte de las aminas. Además, según la prueba de separación de medias solo los tratamientos correspondientes a la spiroxamina (T5) y al fenpropimoprh (T6) superaron al testigo relativo ($P\leq 0,0157$).

El análisis de varianza tampoco detectó diferencias causadas por los diferentes DPI ($P= 0,9859$; Figura 11) y no se mostró interacción entre los tratamientos y los DPI ($P= 0,7035$), no obstante, el análisis de la varianza evidenció diferencias causadas por el estado de apertura de la hoja candela ($P< 0,0001$). Mediante la prueba de T de Student realizada para comparar el efecto del testigo relativo (T12) y absoluto (T13), no se encontraron diferencias entre estos tratamientos ($P= 0,9789$).

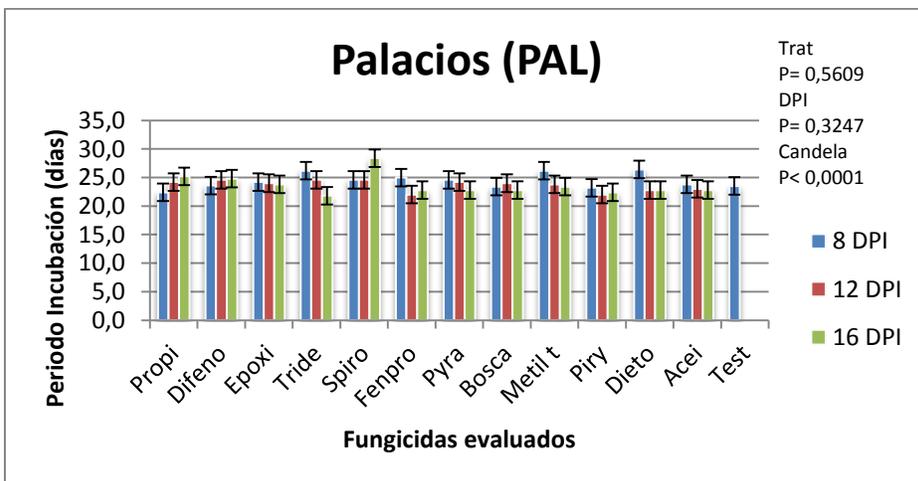
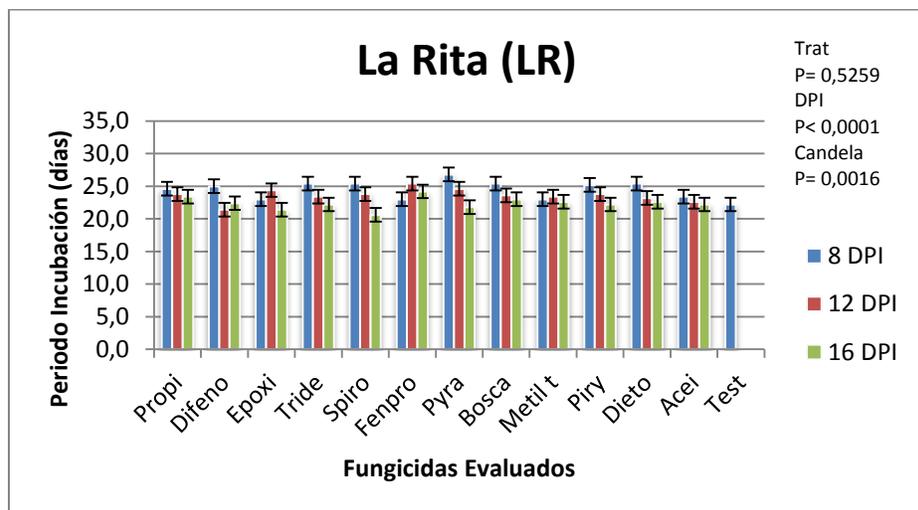
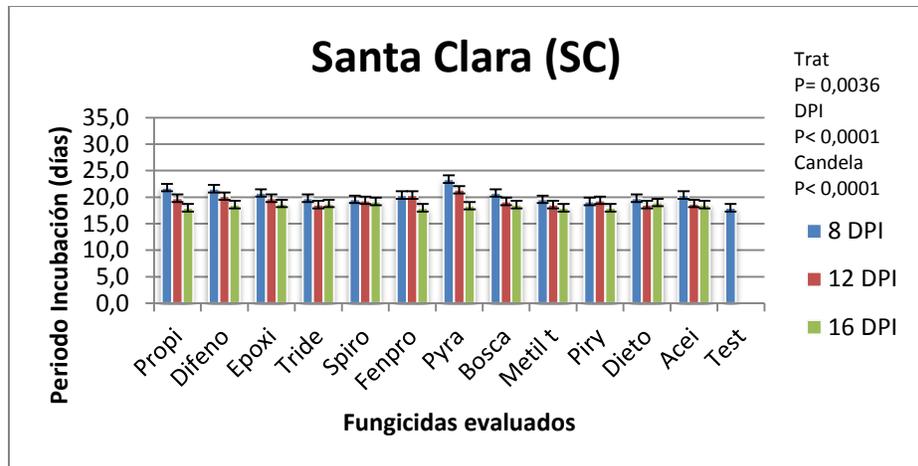


Figura 9. Periodos de incubación observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en 8, 12 y 16 DPI, en cada una de las parcelas experimentales. Nótese los PI más cortos en la población silvestre (SC). CORBANA, 2015.

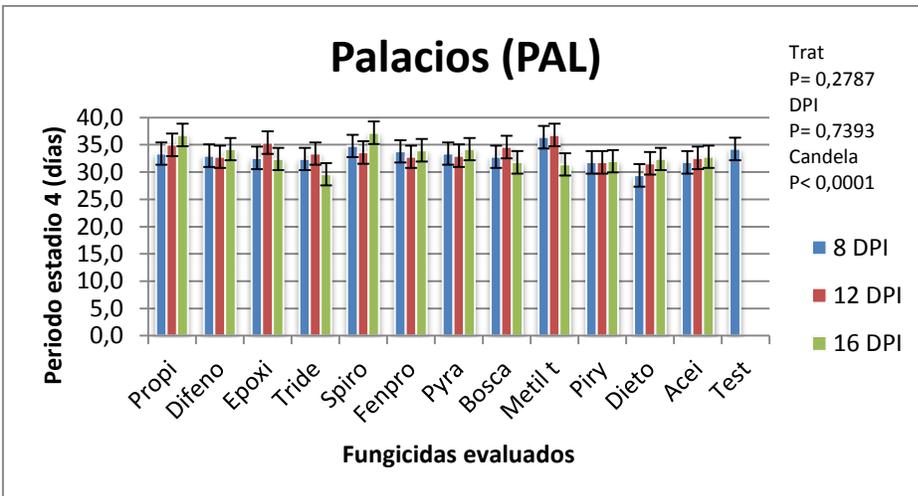
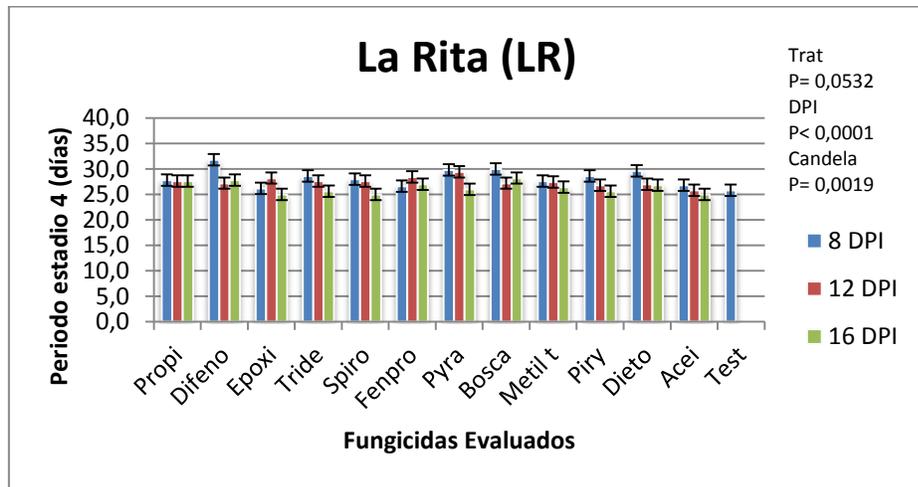
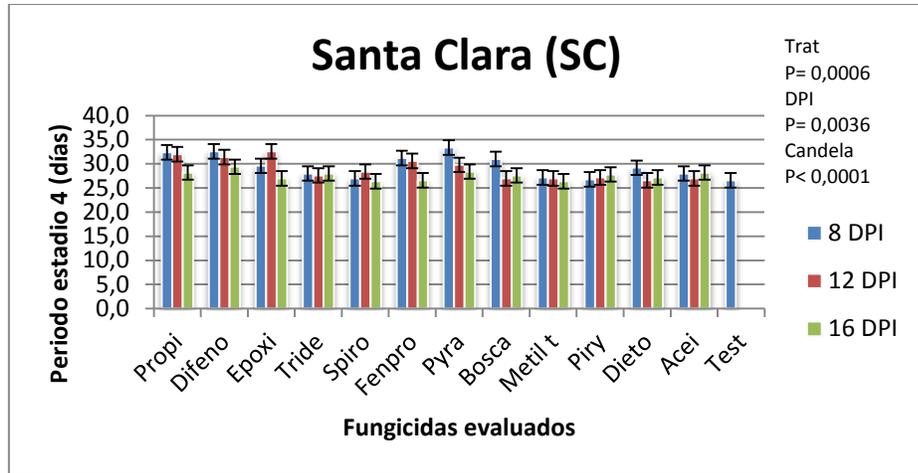


Figura 10. Periodos en alcanzar el estadio 4 de los síntomas de la Sigatoka negra, observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en 8, 12 y 16 DPI, en cada una de las parcelas experimentales. Nótese los PE4 más extensos en la población menos sensible (PAL). CORBANA, 2015.

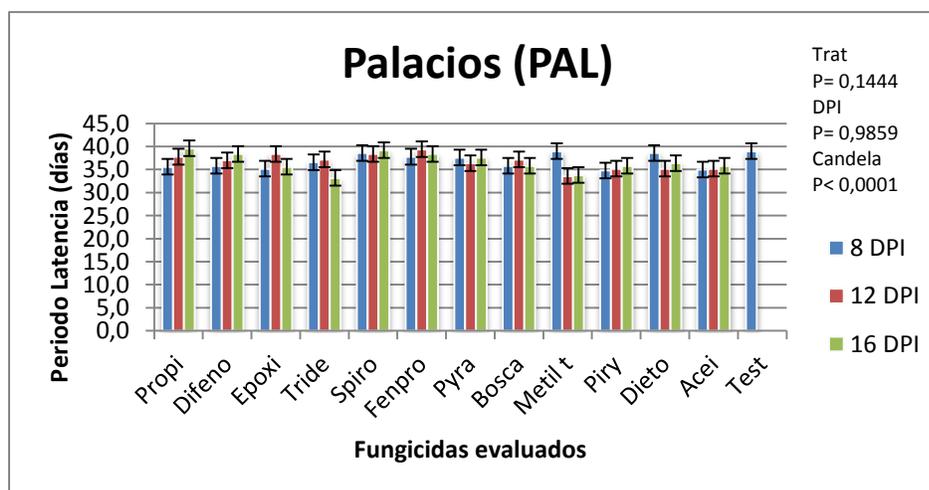
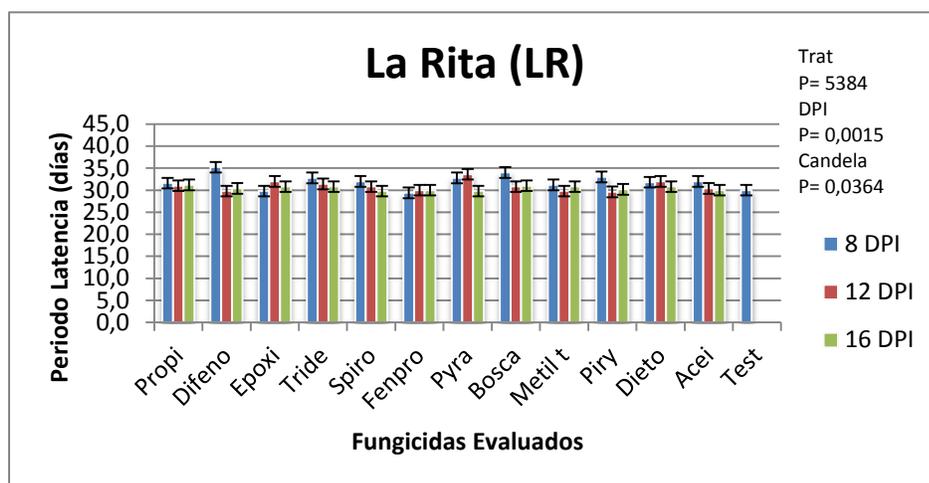
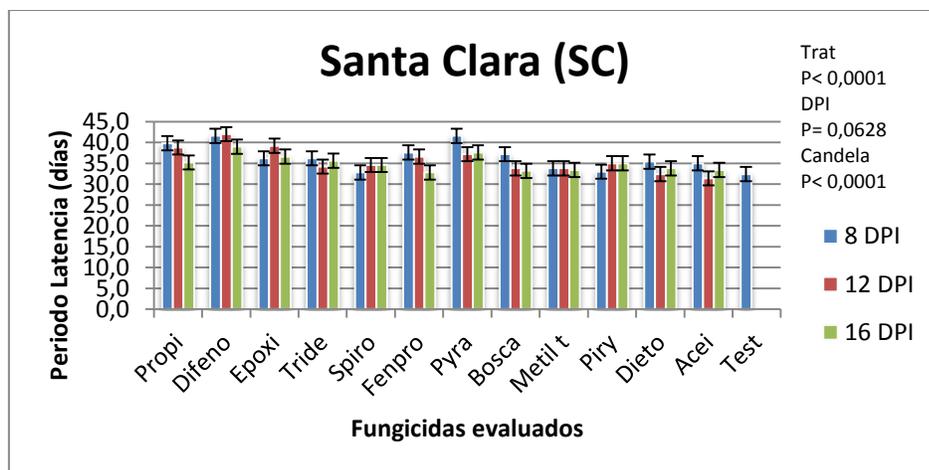


Figura 11. Periodos de latencia observados en los diferentes tratamientos de fungicidas aplicados en 8, 12 y 16 DPI, en cada una de las parcelas experimentales. Nótese la diferencia poco marcada entre la población silvestre (SC) y la menos sensible (PAL) para esta variable. CORBANA, 2015.

4.2.2.4. Evolución de la Severidad (% de necrosis) en el área aplicada con los diferentes fungicidas sistémicos.

4.2.2.4.1. Severidad Santa Clara

Las evaluaciones de la severidad iniciaron cuando se presentaron los primeros estadios de mancha en el área donde se aplicaron los tratamientos y periódicamente hasta que los testigos presentaran el 100% de necrosis (Cuadro 14). Según los resultados del análisis de varianza, al inicio de las evaluaciones no se presentaron diferencias en la severidad de los diferentes tratamientos (25 DPI, $P= 0,2027$). Sin embargo, con el paso de los días el efecto de los tratamientos se fue haciendo más notorio y se presentaron diferencias entre ellos en las evaluaciones posteriores ($P\leq 0,0004$). En esta población la tendencia fue hacia un incremento rápido de la severidad (% de necrosis) tanto en los testigos (aceite y absoluto) como en los tratamientos con fungicidas. Pocos tratamientos presentaron un buen desempeño (menor porcentaje de área necrosada por la Sigatoka negra) con respecto al testigo relativo (aceite). De esta manera, según los resultados de la prueba de separación de medias, se logró determinar que solamente los tratamientos propiconazole (T1), difenoconazole (T2), epoxiconazole (T3), tridemorph (T4), fenpropimorph (T6) y pyraclostrobin (T7) fueron estadísticamente diferentes al tratamiento de aceite hasta la evaluación realizada a los 35 DPI ($P\leq 0,0558$). A los 40 DPI solo el T1, T2, T3, T6 y T7 fueron diferentes al aceite ($P\leq 0,0181$), sin embargo, el T6 lo fue solo con un 10% de significancia ($P= 0,0704$). En la última evaluación realizada a los 45 DPI solamente el T1, T2, T3 y T7 tuvieron un efecto superior al tratamiento de aceite ($P\leq 0,0235$).

Los diferentes DPI mostraron efecto a partir de la evaluación realizada a los 30 DPI y hasta los 40 DPI ($P\leq 0,0261$), mientras que en la primera y última evaluación no se mostró ninguna diferencia causada por este factor ($P\geq 0,1048$). Así los tratamientos aplicados en 8 DPI mostraron en promedio el mejor efecto, aunque en la evaluación de 30 DPI no se mostraron diferencias entre los tratamientos aplicados en 8 y 12 DPI ($P= 0,1775$) pero si con los de 16 DPI ($P= 0,0070$) y en las

evaluaciones de 35 y 40 DPI los tratamientos de 8 DPI superaron a los de 12 y 16 DPI ($P \leq 0,0530$).

No se presentó interacción entre los tratamientos y los DPI ($P \geq 0,1047$) y el efecto causado por los diferentes estados de candela donde se aplicaron los tratamientos, solo fue significativo en la evaluación realizada a los 25 DPI ($P < 0,0001$), donde los tratamientos aplicados en candelas con estados de desarrollo de 0 a 6 presentaron menor porcentaje de necrosis que los aplicados en candelas 8.

Como se puede observar en las Figuras 12, 13 y 14, resultados de 8, 12 y 16 DPI respectivamente, la severidad aumentó rápidamente, muy similar a los testigos y las diferencias fueron poco marcadas. En los tratamientos de 8 DPI (Figura 12) se observa que los mejores tratamientos fueron los correspondientes al pyraclostrobin, difenoconazole y propiconazole, mientras que el fenpropimorph fue ligeramente mejor que el aceite. Además, se puede ver como los demás tratamientos mostraron una severidad similar al aceite e inclusive superior como el tridemorph, metil tiofanato y la spiroxima, también se puede notar como el pirymitanil fue el peor tratamiento, ya que superó la severidad del testigo absoluto. En las aplicaciones de 12 DPI (Figura 13) se notan más claramente las diferencias entre los mejores tratamientos y los testigos, con una tendencia en el incremento de la severidad muy similar a los aplicados en 8 DPI.

Se puede observar que el mejor fungicida fue el difenoconazole seguido del fenpropimorph, propiconazole, epoxiconazole y pyraclostrobin. Además se nota que el tridemorph en las primeras evaluaciones muestra menor severidad que los testigos, mientras que los demás tratamientos muestran una tendencia en su severidad muy similar a estos. Para las aplicaciones de 16 DPI (Figura 14) las diferencias son poco marcadas, donde el difenoconazole siguió mostrando el mejor efecto. En este caso los fungicidas pyraclostrobin, epoxiconazole, propiconazole y en menor medida el tridemorph, también siguieron mostrando menor severidad que los testigos, mientras que en los restantes tratamientos la severidad fue muy similar a los mismos.

4.2.2.4.2. Severidad La Rita

Al igual que en la parcela experimental de Santa Clara las evaluaciones de la severidad iniciaron cuando se presentaron los primeros estadios de mancha en el área donde se aplicaron los tratamientos y periódicamente hasta que los testigos presentaran el 100% de necrosis (Cuadro 15). En este caso, según los resultados de los análisis de la varianza, se evidenciaron diferencias entre los tratamientos en todas las evaluaciones realizadas ($P \leq 0,0244$).

Esta población presentó una tendencia de incremento rápido en la severidad (% de necrosis), al igual que en la población silvestre y pocos fungicidas mostraron mejor desempeño (menor porcentaje de área necrosada por la Sigatoka negra) que el tratamiento de aceite. La prueba de separación de medias encontró que para la primera evaluación realizada a los 30 DPI, los tratamientos propiconazole (T1), difenoconazole (T2), tridemorph (T4), fenpropimorph (T6), pyraclostrobin (T7), boscalid (T8) y dietofencarb (T11) presentaron porcentajes de severidad significativamente menores al tratamiento de aceite ($P \leq 0,0128$). En la segunda evaluación, realizada a los 34 DPI, solamente el T2, T4, T7 y T11 mostraron diferencias con ese mismo tratamiento ($P \leq 0,0204$). No obstante, el T1 ($P = 0,0604$), T6 ($P = 0,0889$) y T8 ($P = 0,0763$) también mostraron menor severidad, pero las diferencias fueron detectadas con 10% de significancia. Para las evaluaciones realizadas a los 40 y 44 DPI, únicamente el T2, T7 y T11 presentaron menor porcentaje de área necrosada por Sigatoka negra ($P \leq 0,0315$) que el testigo relativo y en la evaluación final llevada a cabo a los 47 DPI, sólo el T2 y T11 presentaron mejor efecto que el tratamiento de aceite ($P \leq 0,0333$).

Cuadro 14. Porcentajes de severidad o necrosis, en el área de aplicación de los tratamientos de fungicidas, para los diferentes DPI, en las evaluaciones realizadas a lo largo del experimento en la parcela experimental de Santa Clara. CORBANA, 2015.

Trat. ¹	Momento de evaluación según los días después de la infección (DPI)																			
	Evaluación 25 DPI				Evaluación 30 DPI				Evaluación 35 DPI				Evaluación 40 DPI				Evaluación 45 DPI			
	Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación			
	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.
T1	0,1	0,1	0,5	0,2	1,1	7,9	10,0	6,4	23,9	39,6	61,3	41,6	53,7	56,7	77,5	62,6	71,7	66,3	86,3	74,7
T2	0,0	0,0	0,6	0,2	0,9	0,6	1,7	1,1	8,2	14,8	17,1	13,4	29,6	35,0	37,5	34,0	55,4	47,9	49,6	51,0
T3	5,4	0,0	2,1	2,5	22,3	3,1	20,8	15,4	45,4	32,1	50,2	42,6	77,9	66,5	66,2	70,2	87,5	75,8	76,7	80,0
T4	0,2	0,4	2,2	0,9	7,7	12,1	16,9	12,2	37,9	59,6	57,9	51,8	83,3	93,7	84,2	87,1	95,8	98,7	93,3	96,0
T5	2,7	2,1	0,5	1,8	19,2	38,0	32,5	29,9	63,8	62,9	81,3	69,3	85,4	89,2	98,3	91,0	97,1	98,7	100,0	98,6
T6	0,0	0,1	18,9	6,3	2,1	2,4	34,8	13,1	38,1	21,3	77,9	45,8	72,5	56,3	95,8	74,9	83,3	78,7	99,2	87,1
T7	0,0	0,6	0,1	0,2	0,4	14,6	4,2	6,4	6,8	42,5	37,9	29,1	32,5	71,7	70,0	58,1	47,5	77,1	90,4	71,7
T8	0,1	1,5	1,3	0,9	23,3	29,3	34,4	29,0	41,7	66,7	68,7	59,0	70,0	94,2	90,4	84,9	78,7	99,6	94,6	91,0
T9	5,8	1,4	0,6	2,6	15,8	20,5	29,2	21,8	50,8	69,2	71,7	63,9	85,4	92,1	99,2	92,2	95,0	96,7	100,0	97,2
T10	5,6	0,4	0,8	2,3	28,9	25,4	36,7	30,3	72,9	62,5	66,7	67,4	95,8	92,1	95,4	94,5	98,8	97,1	98,3	98,1
T11	4,6	2,3	1,4	2,7	15,4	16,9	28,1	20,1	46,7	66,3	64,6	59,2	77,1	91,7	92,5	87,1	89,2	97,5	95,8	94,2
T12	2,9	2,5	0,5	2,0	12,4	46,7	37,9	32,3	44,6	85,0	82,1	70,6	75,4	95,8	97,5	89,6	90,0	99,6	99,6	96,4
T13	2,9			2,9	24,8			24,8	70,8			70,8	88,8			88,8	97,9			97,9
				P> F				P> F				P> F				P> F				P> F
Trat.				0,2072				0,0004				<0,0001				<0,0001				<0,0001
DPI				0,3068				0,0261				0,0002				0,0042				0,1048
Trat*DPI				0,1047				0,8878				0,5316				0,5248				0,6245
Candela				<0,0001				0,0849				0,0974				0,2018				0,1100

1/T1= Propiconazole, T2= Difenconazole, T3= Epoxiconazole, T4= Tridemorph, T5= Spiroxamina, T6= Fenpropimorph, T7= Pyraclostrobin, T8= Boscalid, T9= Metil tiofanato, T10= Pirymetanil, T11= Dietofencarb, T12= Testigo relativo (aceite), T13= Testigo absoluto.

El efecto de los diferentes DPI fue mostrado desde el inicio de las evaluaciones hasta la evaluación realizada a los 40 DPI ($P \leq 0,0350$), donde los tratamientos aplicados en 8 DPI mostraron mejor efecto que los aplicados en 12 y 16 DPI en las dos primeras evaluaciones (30 y 34 DPI; $P \leq 0,0080$), mientras que en las evaluaciones de 40 DPI no se presentaron diferencias entre los tratamientos de 8 y 12 DPI ($P \geq 0,1977$) pero si con los de 16 DPI ($P \leq 0,0338$). En las dos últimas evaluaciones (44 y 47 DPI) no se mostró efecto de este factor ($P \geq 0,1308$). No se detectó ningún efecto causado por la interacción de los tratamientos y los DPI ($P \geq 0,1676$) y el efecto causado por el estado de desarrollo de la hoja candela solo fue significativo en las evaluaciones de 30 y 34 DPI ($P \leq 0,0489$), donde de igual forma, los tratamientos aplicados en candelas con estados de desarrollo entre 0 y 6 presentaron menor porcentaje de necrosis que los aplicados en candelas 8.

En las Figuras 12, 13 y 14, resultados de 8, 12 y 16 DPI, respectivamente, se puede observar que la severidad aumentó rápidamente, muy similar a los testigos y las diferencias fueron poco marcadas al igual que en la población silvestre (SC). En los tratamientos de 8 DPI (Figura 12) se observó que los mejores tratamientos (presentaron menor porcentaje de área necrosada) fueron el difenoconazole, dietofencarb, pyraclostrobin, boscalid y ligeramente por debajo del aceite el pirymetanil y el tridemorph en las evaluaciones iniciales. Se puede notar también, que los demás tratamientos presentan porcentajes de severidad similares e inclusive mayores que el aceite, muy fácil de observar en el metil tiofanato, propiconazole, fenpropimorph y epoxiconazole. En este último tratamiento el 100% de necrosis fue alcanzado aún más rápido que en el testigo absoluto, siendo el peor tratamiento de este grupo.

En las aplicaciones de 12 DPI (Figura 13) las diferencias entre tratamientos se hacen más pequeñas y se destacan los tratamientos correspondientes al pyraclostrobin, dietofencarb, epoxiconazole, tridemorph, propiconazole, difenoconazole y fenpropimorph. Los demás tratamientos mostraron porcentajes de severidad muy similares al aceite y testigo absoluto y en este grupo de

tratamientos el pirymetanil alcanzó el 100% de necrosis aún más rápido que los mismos. Para las aplicaciones de 16 DPI (Figura 14), las diferencias entre los tratamientos fueron poco evidentes y la severidad aumentó fuertemente. Para este grupo de tratamientos, el aceite sobrepasó la severidad del testigo absoluto, al igual que el metil tiofanato y el epoxiconazole, mientras que los tratamientos que claramente presentaron mejor efecto (menor % de necrosis) con respecto a los testigos fueron el pyraclostrobin, dietofencarb, difenoconazole, propiconazole, fenpropimorph y en menor grado el boscalid.

Cuadro 15. Porcentajes de severidad o necrosis, en el área de aplicación de los tratamientos de fungicidas, para los diferentes DPI, en las evaluaciones realizadas a lo largo del experimento en la parcela experimental de La Rita. CORBANA, 2015.

Trat ¹	Momento de evaluación según los días después de la infección (DPI)																			
	Evaluación 30 DPI				Evaluación 34 DPI				Evaluación 40 DPI				Evaluación 44 DPI				Evaluación 47 DPI			
	Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación			
	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.
T1	11,7	19,6	9,6	13,6	37,9	39,6	45,8	41,1	94,2	78,8	90,8	87,9	96,7	83,3	92,9	91,0	100,0	88,34	100,0	96,1
T2	0,4	26,7	16,3	14,4	5,8	50,0	37,9	31,2	32,5	86,3	78,3	65,7	43,7	87,5	83,3	71,5	62,5	88,34	100,0	83,6
T3	25,4	15,0	30,8	23,8	50,8	43,8	63,3	52,6	100,0	69,6	100,0	89,9	100,0	85,4	100,0	95,1	100,0	92,5	100,0	97,5
T4	7,9	13,7	16,7	12,8	17,9	30,8	59,2	36,0	85,0	82,5	90,0	85,8	90,8	90,0	91,7	90,8	100,0	91,66	94,58	95,4
T5	13,3	35,0	21,4	23,2	30,8	57,9	49,5	46,1	88,3	82,5	87,5	86,1	89,2	83,8	90,6	87,8	91,7	86,26	100,0	92,6
T6	15,0	13,7	18,0	15,6	40,8	45,8	39,6	42,1	93,3	83,3	85,0	87,2	100,0	91,7	87,5	93,1	100,0	96,26	87,5	94,6
T7	4,2	4,6	5,8	4,9	15,8	15,0	37,5	22,8	60,0	43,3	70,8	58,1	77,9	57,9	87,1	74,3	100,0	79,58	96,66	92,1
T8	7,5	25,8	15,0	16,1	22,9	51,7	49,6	41,4	56,6	89,2	80,4	75,4	73,1	92,5	96,3	87,3	87,1	96,66	100,0	94,6
T9	19,6	28,3	25,4	24,5	46,2	57,9	60,0	54,7	84,2	91,7	99,2	91,7	96,7	96,7	100,0	97,8	100,0	100,0	100,0	100,0
T10	16,3	37,1	14,6	22,6	29,6	54,2	58,8	47,5	73,7	100,0	88,3	87,4	84,6	100,0	90,0	91,5	100,0	100,0	92,5	97,5
T11	8,7	25,8	16,3	16,9	23,3	37,5	47,1	36,0	58,3	71,7	77,5	69,2	67,9	73,8	91,2	77,6	80,8	78,34	100,0	86,4
T12	18,3	29,6	49,2	32,4	35,8	60,8	77,1	57,9	78,8	90,8	100,0	89,9	90,0	96,7	100,0	95,6	96,7	100,0	100,0	98,9
T13	32,5			32,5	58,4			58,4	91,7			91,7	94,2			94,2	96,2			96,2
				P> F				P> F				P> F				P> F				P> F
Trat				0,0021				0,0103				0,0035				0,0150				0,0178
DPI				0,0009				<0,0001				0,0350				0,0956				0,1015
Trat*DPI				0,4969				0,8552				0,3292				0,4333				0,1676
Candela				0,0058				0,0489				0,1015				0,2411				0,7536

1/T1= Propiconazole, T2= Difenconazole, T3= Epoxiconazole, T4= Tridemorph, T5= Spiroxamina, T6= Fenpropimorph, T7= Pyraclostrobin, T8= Boscalid, T9= Metil tiofanato, T10= Pirymetanil, T11= Dietofencarb, T12= Testigo relativo (aceite), T13= Testigo absoluto.

4.2.2.4.3. Severidad Palacios

Las evaluaciones de la severidad como en las otras parcelas, iniciaron cuando se presentaron los primeros estadios de mancha en el área donde se aplicaron los tratamientos y periódicamente hasta que los testigos presentaran el 100% de necrosis (Cuadro 16). Según los resultados de los análisis de varianza, no se detectaron diferencias entre los tratamientos en ninguna de las evaluaciones ($P \geq 0,4456$).

Los diferentes DPI tampoco mostraron efecto alguno sobre los tratamientos ($P \geq 0,1021$) y no se detectó efecto de interacción entre los tratamientos y los DPI ($P \geq 0,2631$). No obstante, los diferentes estados de apertura de la hoja candela en que se aplicaron los tratamientos, si mostraron efecto significativo sobre los tratamientos ($P \leq 0,0233$), donde los tratamientos aplicados en candelas con estados de desarrollo entre 0 y 6 presentaron menor porcentaje de necrosis que los aplicados en candelas de grado 8.

Como se observa en las Figuras (12, 13 y 14), resultados de 8, 12 y 16 DPI respectivamente, la evolución de la severidad en esta población mostró una tendencia de incremento muy leve en comparación con las otras poblaciones (Santa Clara y La Rita) y los testigos tardaron alrededor de 20 días más en alcanzar el 100% de necrosis. En los tratamientos de 8 DPI (Figura 12) se observa que algunos tratamientos mostraron menor severidad que los testigos, a pesar de que los análisis de la varianza y la prueba de separación de medias, no detectaron ninguna diferencia. Como se puede ver, el metil tiofanato muestra menor severidad que los testigos (relativo y absoluto) en todas las evaluaciones y otros como el fenpropimorph, difenoconazole, pyraclostrobin, boscalid y tridemorph en las primeras evaluaciones, también muestran menor severidad que estos, sin embargo, a partir de la evaluación realizada a los 55 DPI muestran una severidad similar e inclusive superior al aceite. La spiroxamina en las evaluaciones iniciales (34 - 49 DPI) mostró una severidad mayor que en el aceite, no obstante, a partir de esa evaluación y hasta la última mostró una severidad

mucho menor que el mismo y presentó el menor porcentaje de severidad de todos los tratamientos al final de las evaluaciones. Por su parte el propiconazole, epoxiconazole y pirymetanil presentaron porcentajes de severidad muy similares al aceite y testigo absoluto en todas las evaluaciones.

En las aplicaciones de 12 DPI (Figura 13) se nota claramente que las diferencias entre los tratamientos y los testigos son muy pequeñas y el efecto de los fungicidas se ha visto muy deteriorado, debido principalmente al desarrollo de resistencia encontrado en esta población. Además, se puede ver que varios tratamientos presentan mayor severidad que el aceite durante las primeras tres evaluaciones, entre ellos el pyraclostrobin, pirymetanil, metil tiofanato, difenoconazole y dietofencarb, los cuales mostraron una tendencia en su severidad muy similar al testigo absoluto. Al inicio de las evaluaciones algunos tratamientos presentaron severidades ligeramente por debajo del aceite, sin embargo, la diferencia fue mínima y no significativa ($P \geq 0,4415$).

Para las aplicaciones de 16 DPI (Figura 14) se notan algunas diferencias mínimas entre los tratamientos, destacando algunos como la spiroxamina, difenoconazole y propiconazole, ya que mantuvieron menor severidad que el aceite durante todas las evaluaciones. En algunos como el dietofencarb, fempropimorph y metil tiofanato, aunque su severidad inició ligeramente por encima del aceite, en evaluaciones posteriores se mantuvieron ligeramente por debajo del mismo y consiguen mantener a una tasa más baja en el incremento de la necrosis del tejido. También se puede observar como los fungicidas pirymetanil, boscalid y tridemorph, incluso desde el inicio, mostraron mayor severidad que los testigos, presentando en las últimas evaluaciones, el mismo nivel de severidad que el testigo absoluto.

Cuadro 16. Porcentajes de severidad o necrosis, en el área de aplicación de los tratamientos de fungicidas para los diferentes DPI, en las evaluaciones realizadas a lo largo del experimento en la parcela experimental finca Palacios. CORBANA, 2015.

Trat ¹	Momento de evaluación según los días después de la infección (DPI)																											
	Evaluación 34 DPI				Evaluación 40 DPI				Evaluación 44 DPI				Evaluación 49 DPI				Evaluación 55 DPI				Evaluación 62 DPI				Evaluación 69 DPI			
	Momento de aplic.				Momento de aplic.				Momento de aplic.				Momento de aplic.				Momento de aplic.				Momento de aplic.							
	8	12	16	Prom.	8	12	16	Prom.	8	12	16	Prom.	8	12	16	Prom.	8	12	16	Prom.	8	12	16	Prom.	8	12	16	Prom.
T1	7,8	1,5	0,3	3,2	21,9	6,1	7,7	11,9	28,0	10,5	14,0	17,5	40,9	26,7	26,7	31,4	67,5	47,9	45,0	53,5	82,1	72,5	79,6	78,1	99,8	93,3	95,4	96,2
T2	2,3	10,4	1,0	4,6	9,0	24,1	8,1	13,7	14,8	32,5	12,7	20,0	33,8	46,2	33,3	37,8	62,1	63,8	48,3	58,1	83,3	82,1	69,6	78,3	99,6	98,3	100	99,3
T3	4,6	2,7	6,0	4,4	15,5	7,1	17,0	13,2	23,4	11,2	28,6	21,1	54,0	23,3	45,0	40,8	75,8	53,7	73,7	67,8	91,3	75,0	88,8	85,0	100	91,3	100	97,1
T4	0,6	0,8	8,4	3,3	6,1	8,9	23,0	12,6	12,5	14,3	30,4	19,1	31,7	23,8	58,8	38,1	59,2	56,3	69,8	61,7	89,2	90,4	94,6	91,4	100	100	100	100
T5	13,3	0,0	0,2	4,5	38,1	4,7	2,7	15,2	40,7	12,9	6,9	20,2	43,5	44,2	17,1	34,9	49,6	67,1	34,2	50,3	57,5	86,7	66,7	70,3	85,4	97,1	99,6	94,0
T6	1,7	6,7	8,8	5,7	5,0	10,8	23,2	13,0	14,6	18,7	40,2	24,5	34,6	45,8	45,0	41,8	60,8	60,4	51,3	57,5	82,9	80,0	65,8	76,2	99,6	86,3	87,5	91,1
T7	6,2	7,7	4,9	6,3	11,7	17,4	21,0	16,7	15,4	25,2	28,3	23,0	41,0	39,2	45,8	42,0	55,8	51,2	63,8	56,9	81,3	69,2	89,6	80,0	100	96,7	100	98,9
T8	1,5	3,0	17,3	7,3	8,1	8,7	33,6	16,8	12,7	21,7	42,3	25,6	33,3	34,2	58,5	42,0	57,1	45,4	73,3	58,6	77,1	65,8	87,1	76,7	98,8	90,8	100	96,5
T9	2,1	13,6	16,2	10,6	6,8	21,5	32,9	20,4	10,2	29,7	36,1	25,3	23,3	43,1	45,4	37,3	39,2	56,7	59,2	51,7	65,8	81,2	74,6	73,9	90,4	95,0	99,6	95,0
T10	6,7	8,8	15,9	10,5	15,8	20,5	28,1	21,5	30,9	26,7	39,6	32,4	41,7	50,8	52,5	48,3	64,2	68,7	62,9	65,3	86,3	73,8	82,5	80,8	100	89,6	100	96,5
T11	9,2	16,0	3,5	9,6	22,1	34,7	18,1	25,0	26,5	41,9	26,1	31,5	32,9	54,4	32,1	39,8	69,2	66,7	56,3	64,0	91,3	82,9	79,2	84,5	100	97,5	100	99,2
T12	11,7	3,6	5,2	6,8	30,3	12,7	13,3	18,8	35,0	20,4	20,2	95,8	47,5	50,0	45,8	47,8	65,0	75,4	63,6	68,0	77,5	91,3	82,1	83,6	95,0	100	100	98,3
T13	4,4			4,4	18,9			18,9	23,9			23,9	39,6			39,6	62,5			62,5	79,6			79,6	94,6			94,6

	P> F				P> F				P> F				P> F				P> F				P> F							
Trat	0,8309				0,9039				0,9196				0,9570				0,7965				0,6991				0,4456			
DPI	0,7598				0,5289				0,4327				0,7566				0,9312				0,9671				0,1021			
Trat*DPI	0,5587				0,2631				0,4763				0,7871				0,9020				0,9307				0,6181			
Candela	<0,0001				<0,0001				<0,0001				<0,0001				<0,0001				<0,0001				0,0233			

1/T1= Propiconazole, T2= Difenconazole, T3= Epxiconazole, T4= Tridemorph, T5= Spiroxamina, T6= Fenpropimorph, T7= Pyraclostrobin, T8= Boscalid, T9= Metil tiofanato, T10= Pirymetamil, T11= Dietofencarb, T12= Testigo relativo (aceite), T13= Testigo absoluto.

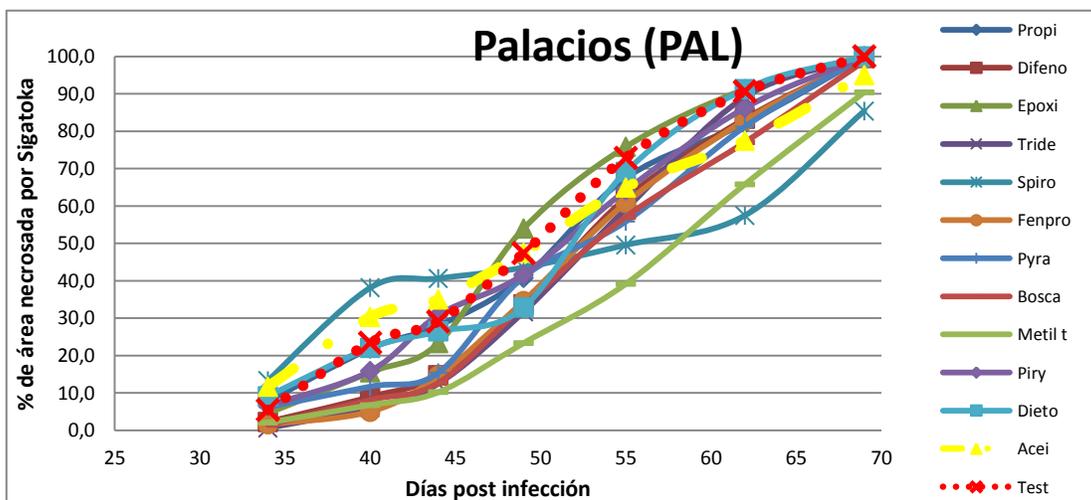
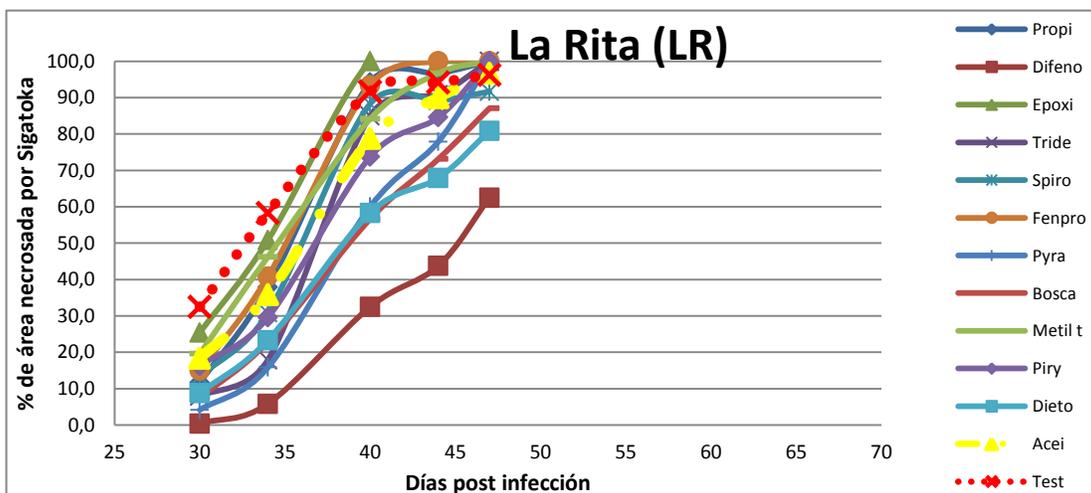
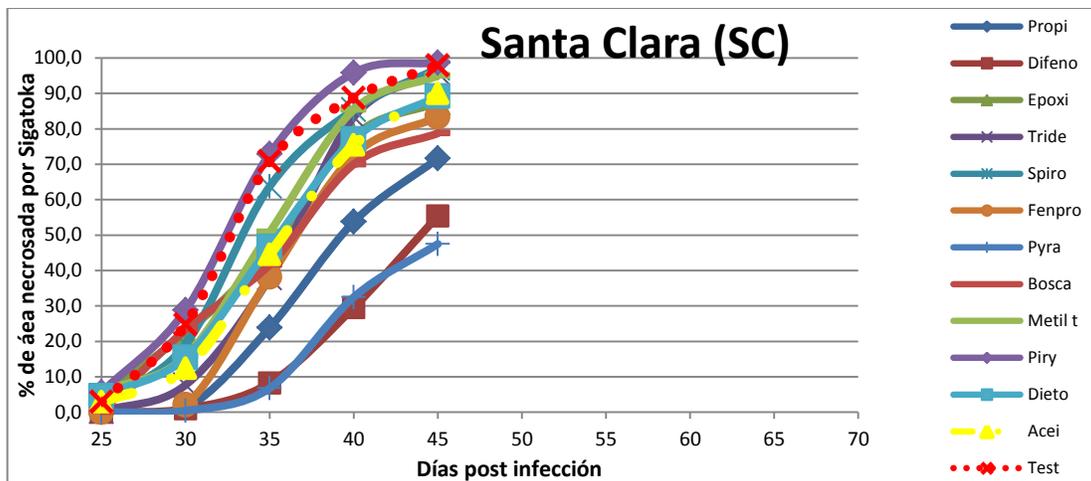


Figura 12. Evolución de la severidad en el área tratada con los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 8 DPI, en cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015.

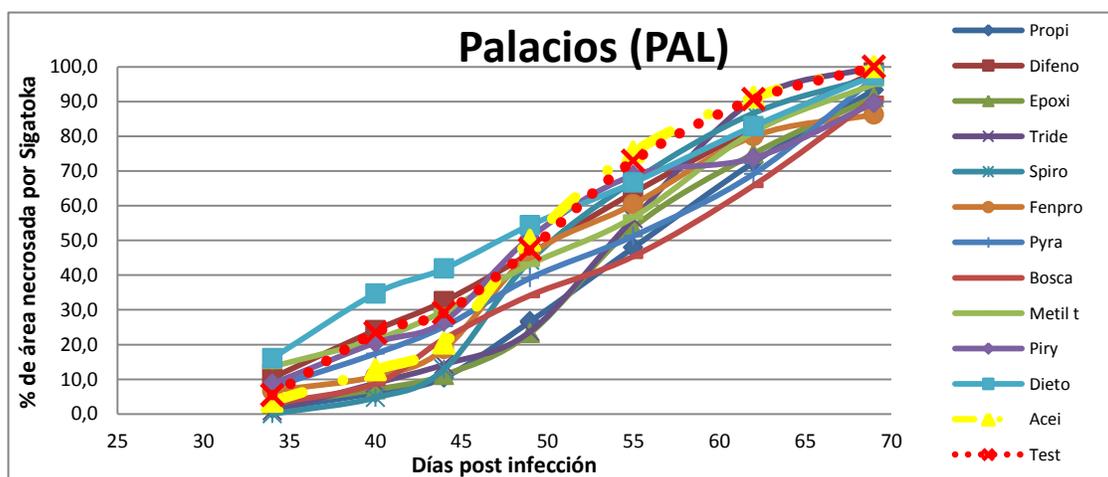
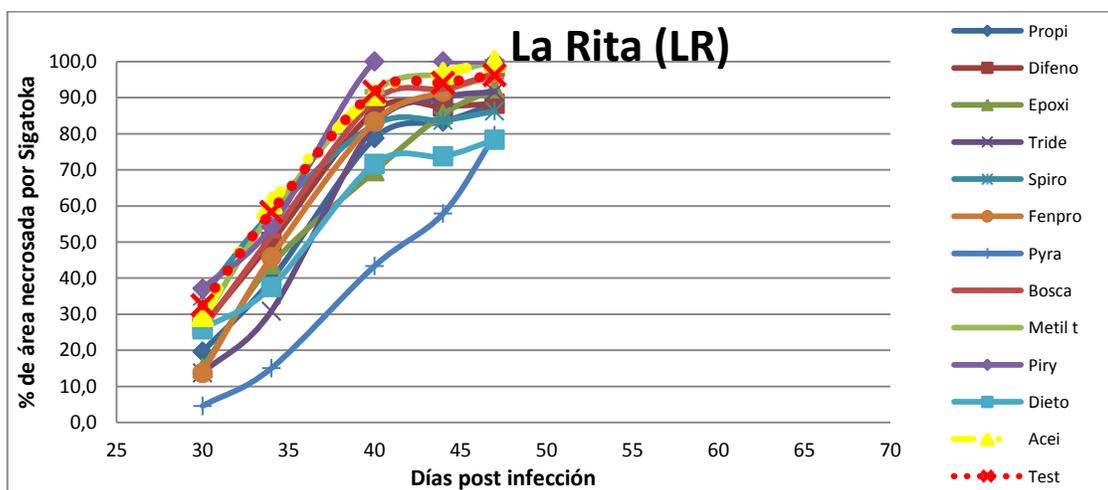
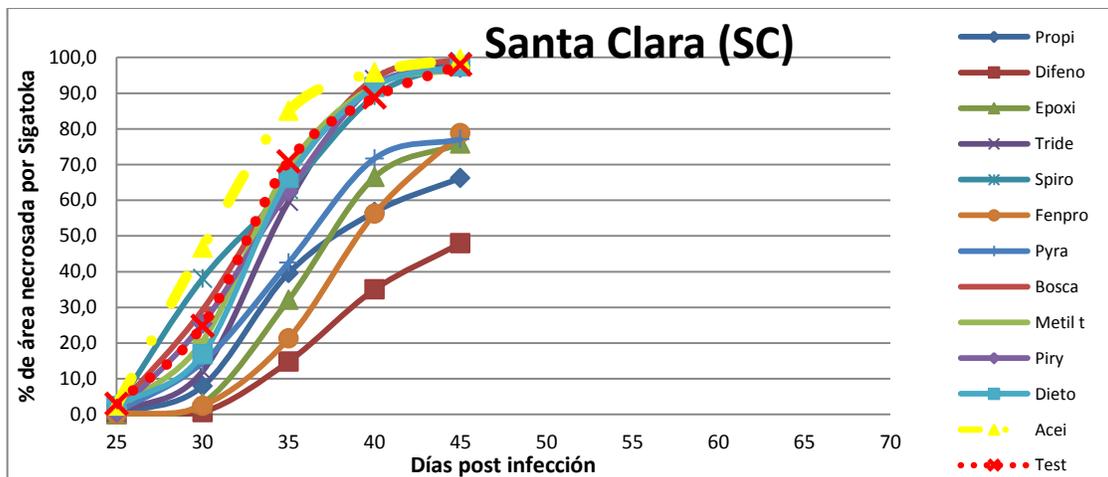


Figura 13. Evolución de la severidad en el área tratada con los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 12 DPI, en cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015.

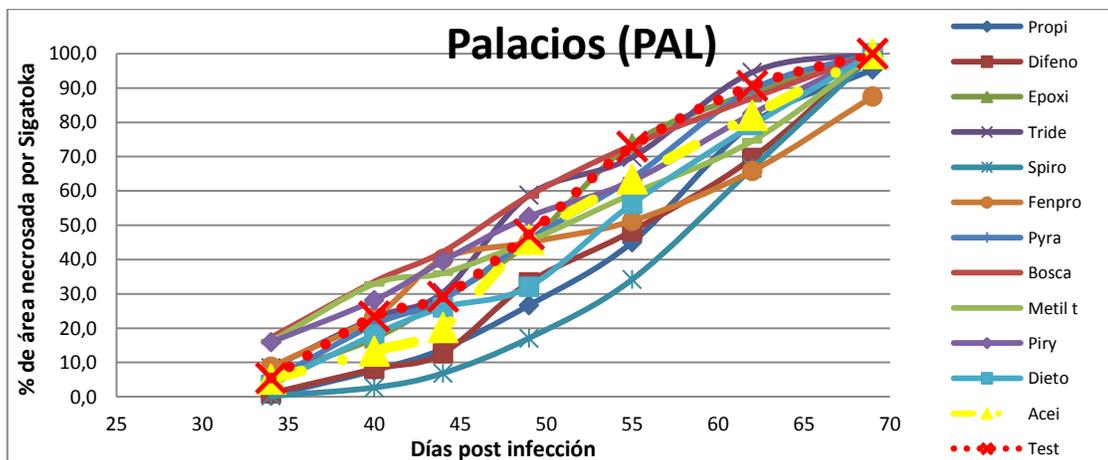
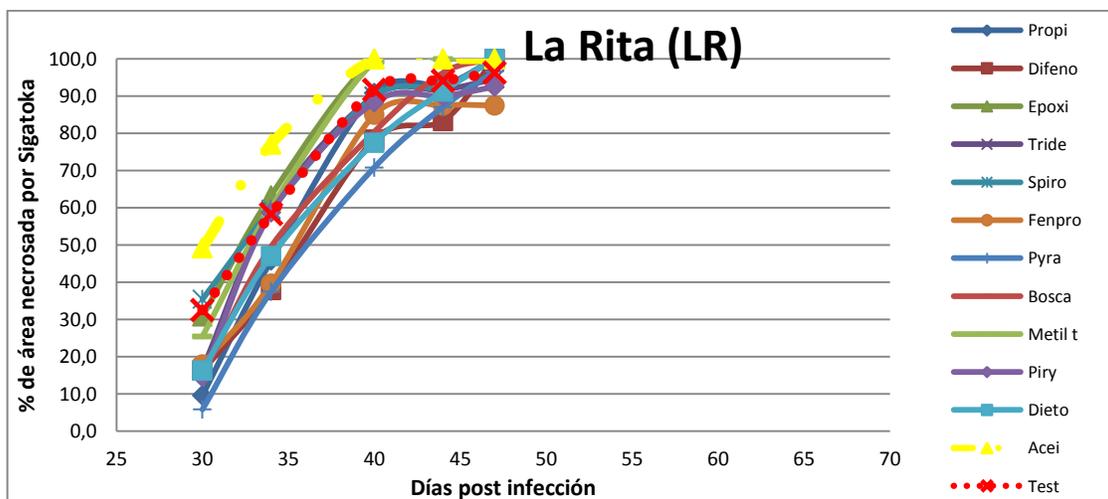
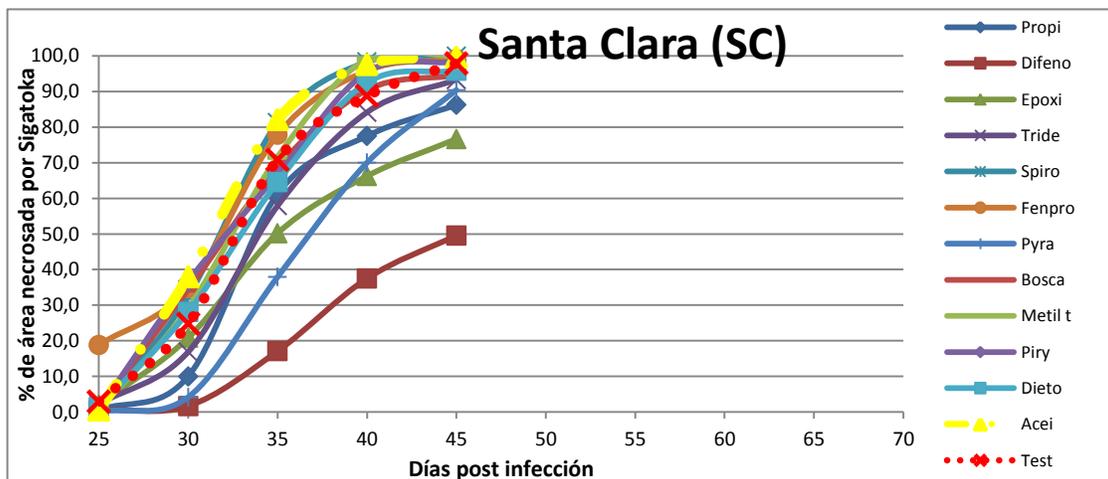


Figura 14. Evolución de la severidad en el área tratada con los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 16 DPI, en cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015.

4.2.2.5. Evaluación de la eficacia de los fungicidas utilizados en el experimento

Los resultados de la eficacia presentada por cada uno de los tratamientos se presentan en los Cuadros 17, 18 y 19, que corresponden a cada una de las parcelas experimentales, Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL), respectivamente. Por otra parte, las Figuras 15, 16 y 17 corresponden al comportamiento de la eficacia de los diferentes fungicidas sistémicos empleados en el experimento, basados en las evaluaciones de la severidad realizadas en los tratamientos aplicados en 8, 12 y 16 DPI correspondientemente, en cada una de las parcelas experimentales. Los valores están dados en porcentajes y fueron obtenidos en base a la eficacia del testigo relativo (aceite), esto porque todos los tratamientos fueron aplicados en emulsión agua–aceite. Por su parte, la eficacia del tratamiento de aceite se calculó a partir del testigo absoluto.

4.2.2.5.1. Eficacia (%) de los fungicidas sistémicos aplicados en Santa Clara

En los tratamientos aplicados a los 8 DPI (Figura 15) se puede observar un decrecimiento rápido en la eficacia de la mayoría de fungicidas y pocos superaron la eficacia del testigo relativo (aceite). Como se puede ver, los tratamientos con mayor eficacia y que superaron el aceite fueron el pyraclostrobin, difenoconazole, propiconazole y con menor magnitud el fenpropimorph y boscalid. Tratamientos como el tridemorph, epoxiconazole, y dietofencarb presentaron porcentajes de eficacia muy similares al aceite en la mayoría de evaluaciones y otros como el metil tiofanato, spiroxamina y pirymetanil mostraron eficacias muy por debajo del mismo.

En la aplicación de tratamientos correspondientes a los 12 DPI (Figura 16) la eficacia del aceite inicia y cae rápidamente, muy por debajo de todos los fungicidas. Como la eficacia de los tratamientos fue obtenida en base a la del aceite, la eficacia de estos aumenta. De esta manera, se puede observar que el difenoconazole mostró muy buena eficacia, aún mayor que en los tratamientos aplicados en 8 DPI. Además, el fenpropimorph y epoxiconazole presentaron

valores de eficacia muy altos, mostrando de igual forma, un mejor efecto en comparación con los tratamientos aplicados a los 8 DPI. Por su parte, el propiconazole se mantuvo muy similar a los anteriores y mostró el segundo valor más alto de eficacia al final de las evaluaciones, mientras que el pyraclostrobin disminuyó su eficacia en comparación con los tratamientos de 8 DPI. El tridemorph, spiroxamina, dietofencarb, boscalid, metil tiofanato y pirymetanil, no mostraron cambios muy marcados con respecto a los aplicados en 8 DPI.

Por último, la eficacia de los tratamientos aplicados en 16 DPI se muestra en la Figura 17. El aceite mostró buena eficacia en la evaluación inicial, lo que condujo a que la mayoría de tratamientos presentaran en la primera evaluación, eficacias muy bajas en comparación con este y solamente el pyraclostrobin y boscalid iniciaron con la misma eficacia que el mismo. Luego de la primera evaluación la eficacia del aceite disminuyó drásticamente, lo que explica el incremento en la eficacia de la mayoría de tratamientos. El difenoconazole presentó el mayor porcentaje de eficacia, seguido del pyraclostrobin, mientras que el propiconazole, epoxiconazole y tridemorph también superaron al aceite pero con menor magnitud. Por otra parte, algunos tratamientos iniciaron con eficacias menores a la presentada por el aceite, sin embargo, pocos días más tarde lograron sobrepasar su eficacia, entre ellos el dietofencarb, pirymetanil, boscalid, metil tiofanato, fenpropimorph y la spiroxamina que mostró el peor desempeño, siempre se mantuvo por debajo del aceite.

Cuadro 17. Porcentajes de eficacia obtenidos en cada uno de los tratamientos aplicados en la parcela experimental de Santa Clara, obtenidos en base a las evaluaciones de la severidad de cada tratamiento en los diferentes DPI. CORBANA, 2015.

Tratamiento ¹	Momento de evaluación según los días después de la infección (DPI)																			
	Evaluación 25 DPI				Evaluación 30 DPI				Evaluación 35 DPI				Evaluación 40 DPI				Evaluación 45 DPI			
	Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación			
	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio
T1	96,4	95,8	60,0	84,1	90,8	83,0	73,6	82,5	52,3	56,5	32,4	47,0	33,5	41,7	22,1	32,4	24,4	33,6	13,6	23,9
T2	100	100	60,0	86,7	92,4	98,7	95,6	95,6	81,5	82,6	79,2	81,1	60,8	63,5	61,5	61,9	38,4	52,0	50,2	46,9
T3	80,0	100	60,0	80,0	58,3	93,3	62,4	71,3	36,6	62,3	43,2	47,4	15,1	31,1	32,6	26,3	9,8	24,1	23,2	19,0
T4	92,9	83,3	60,0	78,7	54,8	74,1	55,5	61,5	30,5	29,9	29,7	30,0	0,0	4,3	14,3	6,2	0,0	1,1	6,4	2,5
T5	72,9	80,0	60,0	71,0	33,3	39,8	17,1	30,1	12,9	31,1	6,0	16,7	7,3	9,1	0,7	5,7	1,0	1,1	0,0	0,7
T6	100	95,8	40,0	78,6	83,2	94,9	35,1	71,0	31,1	75,0	10,3	38,8	20,7	41,3	3,2	21,7	14,1	20,9	0,8	11,9
T7	100	80,0	80,0	86,7	96,6	68,8	89,0	84,8	84,8	50,0	54,1	63,0	56,9	27,0	28,2	37,4	47,2	22,8	9,2	26,4
T8	96,4	71,7	80,0	82,7	60,0	59,2	27,6	48,9	48,8	25,7	22,2	32,2	20,2	3,9	8,4	10,8	18,2	0,3	5,4	8,0
T9	80,0	59,2	60,0	66,4	56,5	56,0	30,3	47,6	18,5	18,6	14,5	17,2	5,6	5,2	0,0	3,6	2,4	3,2	0,0	1,9
T10	72,9	83,3	60,0	72,1	29,1	61,3	32,5	41,0	10,7	30,0	24,5	21,7	0,0	5,2	3,8	3,0	0,0	2,8	1,6	1,5
T11	80,0	71,7	60,0	70,6	43,2	63,8	36,4	47,8	33,5	22,1	22,6	26,1	14,0	5,2	6,2	8,5	7,6	2,4	4,1	4,7
T12	80,0	65,7	82,1	76,0	61,9	15,0	40,0	39,0	38,2	2,4	2,9	14,5	18,9	0,0	0,0	6,3	9,4	0,0	0,0	3,1

1/T1= Propiconazole, T2= Difenconazole, T3= Epoxiconazole, T4= Tridemorph, T5= Spiroxamina, T6= Fenpropimorph, T7= Pyraclostrobin, T8= Boscalid, T9= Metil tiofanato, T10= Pirymetanil, T11= Dietofencarb, T12= Testigo relativo (aceite).

Cuadro 18. Porcentajes de eficacia obtenidos en cada uno de los tratamientos aplicados en la parcela experimental de La Rita, obtenidos en base a las evaluaciones de la severidad de cada tratamiento en los diferentes DPI. CORBANA, 2015.

Trat. ¹	Momento de evaluación según los días después de la infección (DPI)																			
	Evaluación 30 DPI				Evaluación 34 DPI				Evaluación 40 DPI				Evaluación 44 DPI				Evaluación 47 DPI			
	<u>Momento de aplicación</u>				<u>Momento de aplicación</u>				<u>Momento de aplicación</u>				<u>Momento de aplicación</u>				<u>Momento de aplicación</u>			
	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Promedio
T1	61,8	41,7	80,5	61,3	19,3	34,9	42,2	32,1	2,0	19,4	9,2	10,2	1,5	15,9	7,1	8,1	0,0	11,7	0,0	3,9
T2	97,7	31,8	66,9	65,5	83,7	28,5	56,8	56,3	58,7	13,1	21,7	31,2	51,4	12,2	16,7	26,8	36,0	11,7	0,0	15,9
T3	8,2	49,3	49,5	35,7	0,0	34,7	25,4	20,0	0,0	25,4	0,0	8,5	0,0	13,0	0,0	4,3	0,0	7,5	0,0	2,5
T4	73,2	60,3	66,1	66,5	53,3	49,3	29,2	43,9	9,4	15,2	10,0	11,5	8,0	9,0	8,3	8,4	0,0	8,3	5,4	4,6
T5	50,9	20,3	47,3	39,5	28,4	20,8	28,6	25,9	9,4	17,2	10,0	12,2	9,8	16,1	7,5	11,1	7,9	13,8	0,0	7,2
T6	25,9	53,5	63,6	47,7	21,4	29,3	50,3	33,7	0,0	14,3	15,0	9,8	0,0	7,9	12,5	6,8	0,0	3,8	12,5	5,4
T7	77,3	84,5	88,1	83,3	56,7	75,3	51,4	61,1	29,2	54,3	29,2	37,6	11,7	41,5	12,9	22,0	0,0	20,4	3,3	7,9
T8	66,4	25,9	69,5	53,9	42,6	20,8	42,2	35,2	34,1	9,9	19,6	21,2	23,2	7,1	3,8	11,3	12,7	3,3	0,0	5,3
T9	21,8	22,0	48,3	30,7	22,6	12,7	23,8	19,7	9,3	7,2	0,8	5,8	1,5	2,8	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0
T10	46,4	11,8	70,3	42,8	41,6	21,0	26,5	29,7	18,8	0,0	11,7	10,2	12,7	0,0	10,0	7,6	0,0	0,0	7,5	2,5
T11	55,0	33,0	66,9	51,6	50,7	38,4	40,5	43,2	33,7	27,2	22,5	27,8	31,2	25,8	8,8	21,9	18,4	21,7	0,0	13,4
T12	62,1	34,4	17,4	37,9	52,9	12,9	8,6	24,8	17,7	8,2	0,0	8,6	9,4	2,3	0,0	3,9	2,7	0,0	0,0	0,9

1/T1= Propiconazole, T2= Difenconazole, T3= Epoxiconazole, T4= Tridemorph, T5= Spiroxamina, T6= Fenpropimorph, T7= Pyraclostrobin, T8= Boscalid, T9= Metil tiofanato, T10= Pirymetanil, T11= Dietofencarb, T12= Testigo relativo (aceite).

Cuadro 19. Porcentajes de eficacia obtenidos en cada uno de los tratamientos aplicados en la parcela experimental de Palacios, obtenidos en base a las evaluaciones de la severidad de cada tratamiento en los diferentes DPI. CORBANA, 2015.

Trat ¹	Momento de evaluación según los días después de la infección (DPI)																											
	Evaluación 34 DPI				Evaluación 40 DPI				Evaluación 44 DPI				Evaluación 49 DPI				Evaluación 55 DPI				Evaluación 62 DPI				Evaluación 69 DPI			
	Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación				Momento de aplicación							
	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Pro m	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Pro m	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Pro m	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Pro m	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Pro m	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.	8 DPI	12 DPI	16 DPI	Prom.
T1	73,8	62,9	94,0	76,9	54,6	58,4	69,1	60,7	44,0	55,0	62,5	53,8	33,7	58,3	61,8	51,3	19,5	43,0	40,7	34,4	13,0	26,3	16,1	18,5	0,0	6,7	4,6	3,8
T2	80,4	60,0	80,0	73,5	70,4	53,4	50,3	58,1	57,7	45,7	44,5	49,3	29,0	25,7	49,1	34,6	18,3	28,5	50,5	32,4	5,5	15,8	20,4	13,9	0,0	6,7	0,0	2,2
T3	62,1	74,3	60,0	65,5	49,4	73,4	57,3	60,1	41,0	61,6	48,7	50,4	19,8	21,6	42,7	28,0	9,2	37,3	13,8	20,1	5,5	21,6	7,3	11,5	0,0	8,8	0,0	2,9
T4	94,6	77,1	34,0	68,6	80,1	36,2	28,0	48,1	64,3	30,5	27,0	40,6	29,0	15,5	19,1	21,2	20,3	26,4	11,5	19,4	2,4	8,6	2,2	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0
T5	60,0	98,9	96,0	85,0	57,9	63,1	79,7	66,9	56,0	41,2	66,0	54,4	49,9	11,8	62,7	41,5	45,3	24,1	46,2	38,5	37,4	10,9	21,6	23,3	3,9	2,9	0,4	2,4
T6	85,7	37,1	60,0	61,0	83,5	38,7	57,7	59,9	59,8	33,1	48,7	47,2	38,6	11,4	48,2	32,7	26,7	27,8	42,3	32,3	10,4	18,1	28,5	19,0	0,0	13,8	12,5	8,8
T7	65,7	78,5	58,0	67,4	64,7	54,3	49,1	56,0	59,8	44,7	38,8	47,7	42,7	31,4	30,9	35,0	35,6	42,9	22,6	33,7	6,8	28,0	6,3	13,7	0,0	3,3	0,0	1,1
T8	87,1	78,9	40,0	68,7	73,2	43,9	18,1	45,1	63,7	45,3	18,4	42,4	33,8	15,9	25,9	25,2	29,2	46,3	19,0	31,5	12,2	29,8	11,4	17,8	0,0	9,2	0,0	3,1
T9	82,1	51,4	54,0	62,5	77,7	45,2	33,8	52,2	70,8	39,1	30,7	46,9	56,2	20,2	31,8	36,1	50,5	37,9	24,6	37,7	26,7	14,8	19,7	20,4	6,6	5,0	0,4	4,0
T10	76,4	40,0	58,0	58,1	62,1	26,1	29,1	39,1	46,7	27,8	22,9	32,4	28,1	9,4	32,7	23,4	21,4	28,4	23,9	24,6	11,9	24,9	8,2	15,0	0,0	10,4	0,0	3,5
T11	72,9	28,6	76,0	59,1	69,0	29,3	39,7	46,0	61,5	19,0	37,7	39,4	41,9	16,9	52,7	37,2	16,3	24,6	25,9	22,3	0,1	16,8	14,6	10,5	0,0	2,5	0,0	0,8
T12	60,0	54,3	76,2	63,5	48,0	48,4	34,3	43,6	43,6	37,1	42,1	95,8	40,7	22,4	31,9	31,6	25,7	14,3	24,0	21,3	18,6	7,6	15,6	13,9	5,0	0,0	0,0	1,7

1/T1= Propiconazole, T2= Difenconazole, T3= Epoxiconazole, T4= Tridemorph, T5= Spiroxamina, T6= Fenpropimorph, T7= Pyraclostrobin, T8= Boscalid, T9= Metil tiofanato, T10= Pirymetamil, T11= Dietofencarb, T12= Testigo relativo (aceite).

4.2.2.5.2. Eficacia (%) de los fungicidas sistémicos aplicados en La Rita

Los resultados de la eficacia de los tratamientos aplicados en 8 DPI se muestran en la Figura 15 y al igual que en Santa Clara la eficacia mostró una tendencia al decrecimiento rápido desde las primeras evaluaciones. En esta población se puede notar claramente el desarrollo de resistencia a la mayoría de fungicidas empleados para su control, puesto que casi todos muestran eficacias muy por debajo de la mostrada por el aceite. Se nota como el difenoconazole muestra por mucho la mejor eficacia, seguido por el pyraclostrobin, ambos fueron los únicos en mantenerse siempre por encima del aceite. El boscalid y dietofencarb inicialmente muestran una eficacia similar al aceite, sin embargo, en evaluaciones posteriores logran un mejor desempeño. El tridemorph y el pirymetanil mostraron valores de eficacia muy similares al aceite y otros como el propiconazole, spiroxamina, fenpropimorph, metil tiofanato y epoxiconazole mostraron eficacias muy reducidas en comparación con el mismo. Además, se puede notar como el epoxiconazole mostró el peor desempeño y desde la segunda evaluación mostraba 0% de eficacia.

En las aplicaciones de 12 DPI (Figura 16) se observa una marcada disminución en la eficacia de los tratamientos desde la evaluación inicial. En este caso solamente el pyraclostrobin mostró una gran diferencia con respecto al aceite, siendo el mejor tratamiento en este grupo de aplicaciones. El fenpropimorph, epoxiconazole y propiconazole aumentaron su eficacia lo que recalca en estos fungicidas una mayor actividad curativa que los aplicados en 8 DPI, como sucedió también en la parcela de Santa Clara. Los demás tratamientos presentaron eficacias muy bajas y similares al aceite.

Por otra parte, en los tratamientos de 16 DPI (Figura 17), el aceite tuvo una eficacia casi nula e inferior al 20 % llegando rápidamente al 0%, mientras que los tratamientos de fungicidas mostraron una buena eficacia en la primera evaluación, donde el pyraclostrobin y propiconazole fueron los de mejor efecto. La mayoría de tratamientos presentaron una tendencia en la eficacia muy similar, desde la

primera hasta la última evaluación y mantuvieron una eficacia aceptable hasta la evaluación realizada a los 35 DPI. Además como se puede observar, el metil tiofanato y la spiroxamina mostraron las eficacias más bajas de todos los tratamientos de fungicidas.

4.2.2.5.3. Eficacia (%) de los fungicidas aplicados en Palacios

La eficacia de los tratamientos aplicados a los 8 DPI, en la población de Palacios se muestra en la Figura 15. Todos expresaron una tendencia de disminución más leve que en las otras poblaciones y mantuvieron su eficacia por mayor tiempo. Como se puede observar en las tres primeras evaluaciones (34 DPI hasta 44 DPI) la mayoría de tratamientos mantuvieron su eficacia por encima del tratamiento de aceite, excepto el propiconazole y epoxiconazole que se mantuvieron muy similares al mismo desde el inicio de las evaluaciones. Sin embargo, a partir de los 44 DPI todos los tratamientos disminuyeron su eficacia y solamente el metil tiofanato y spiroxamina lograron mantenerse por encima del aceite. En esta población no se encontraron tratamientos que sobresalieran por su buena eficacia a lo largo de todas las evaluaciones con respecto al testigo y en su mayoría mostraron un comportamiento similar al mismo.

Por otra parte, en las evaluaciones de la eficacia de los tratamientos aplicados en 12 DPI (Figura 16) se puede observar que la spiroxamina mostró casi 100% de eficacia en la primera evaluación, superando a todos los tratamientos, sin embargo, en las evaluaciones posteriores, su eficacia disminuyó fuertemente. Además, el epoxiconazole, pyraclostrobin, boscalid, propiconazole y difenoconazole lograron mantener su eficacia levemente superior a la del aceite, durante todas las evaluaciones. Por su parte, el metil tiofanato se mantuvo muy similar al testigo y el pirymetanil, fenpropimorph y dietofencarb presentaron eficacias menores al aceite. En la evaluación correspondiente a los 55 DPI, la mayoría de tratamientos incrementaron su eficacia, producto de que la misma se determinó en base a la del aceite y como la de éste disminuyó más severamente, la eficacia de los fungicidas se ve incrementada.

El desarrollo de resistencia en esta población ha tenido repercusiones en la efectividad de los fungicidas, pues no sobresalen unos sobre otros como en la población silvestre y la eficacia presentada por los tratamientos de fungicidas no fue muy diferente a la del testigo relativo (aceite). Por último, en los tratamientos aplicados en 16 DPI (Figura 17) se puede observar que solo la spiroxamina, el propiconazole y el fenpropomorph a partir de la segunda evaluación, se mantuvieron muy superiores al aceite durante todas las evaluaciones, mientras que los demás tratamientos mantuvieron una eficacia muy similar al mismo.

Los análisis de la varianza realizados para la variable de severidad en esta población, no detectaron diferencias entre los tratamientos de fungicidas ni de estos con el aceite, por lo que se podría asumir que para la eficacia tampoco hay diferencias entre los tratamientos y que esto es debido al fuerte desarrollo de resistencia encontrado en esta población, donde la aplicación de aceite mineral presenta casi el mismo resultado que la aplicación de los diferentes fungicidas en emulsión agua–aceite, con la misma dosis de aceite utilizada en el testigo relativo.

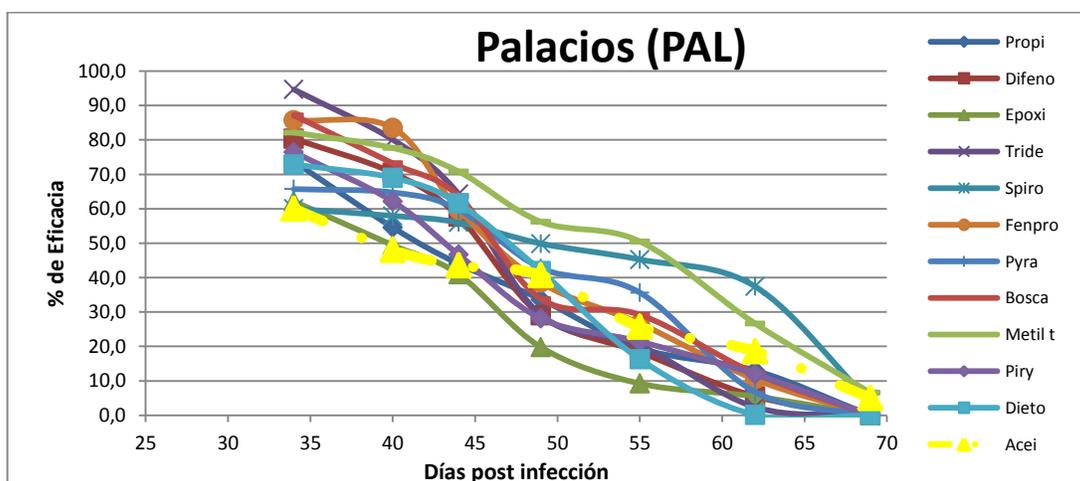
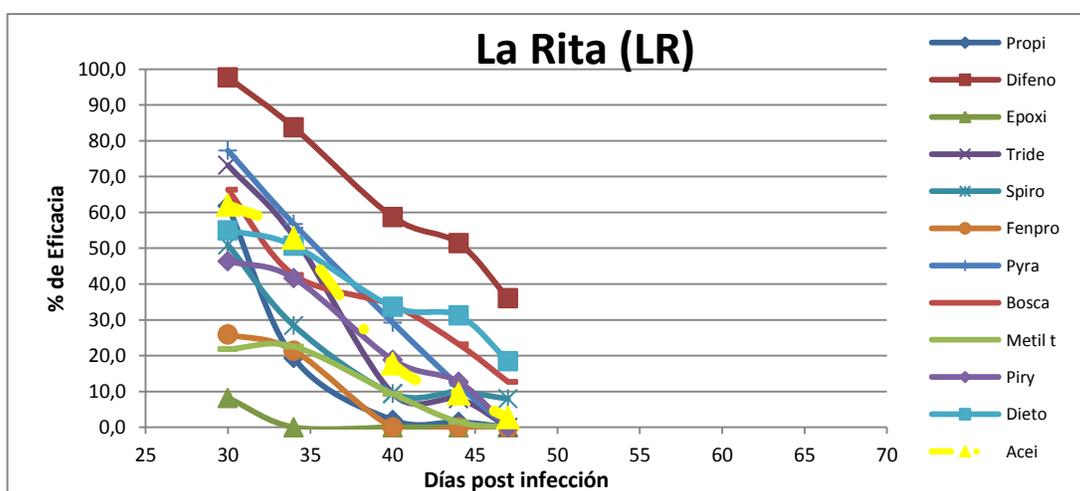
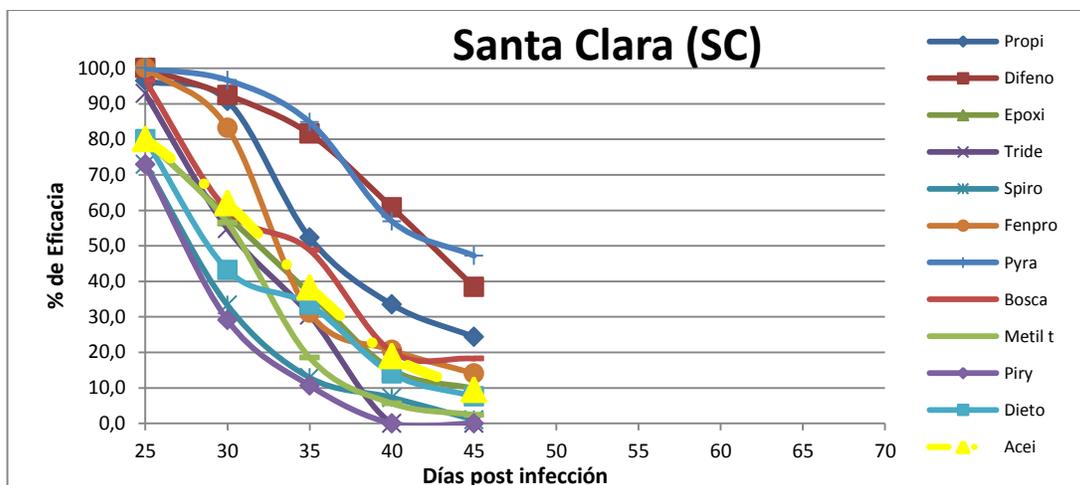


Figura 15. Comportamiento de la eficacia de los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 8 DPI, para cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015.

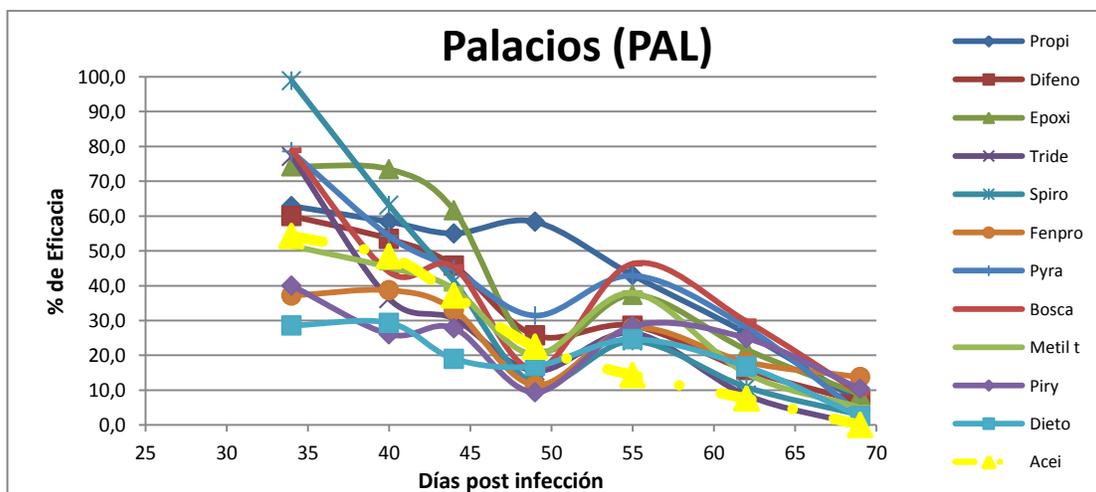
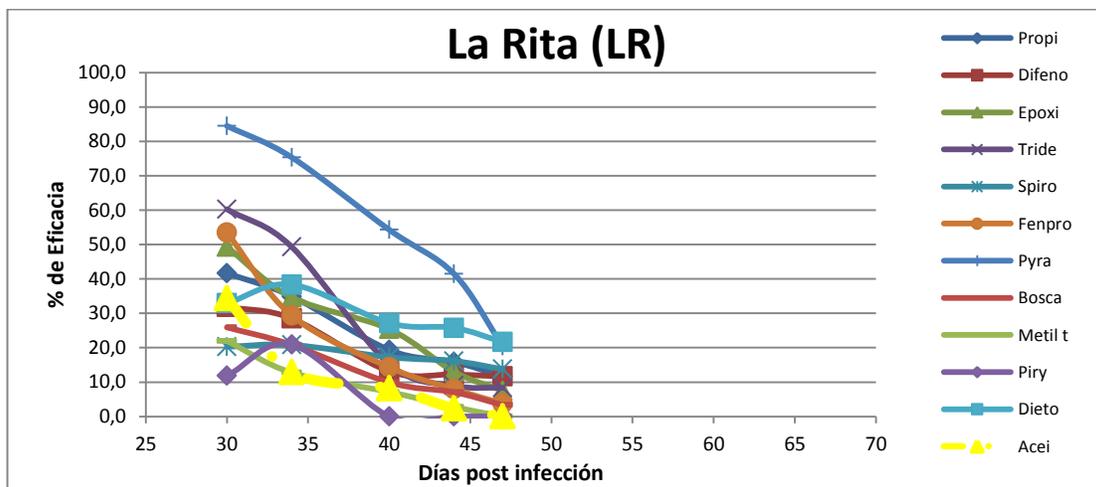
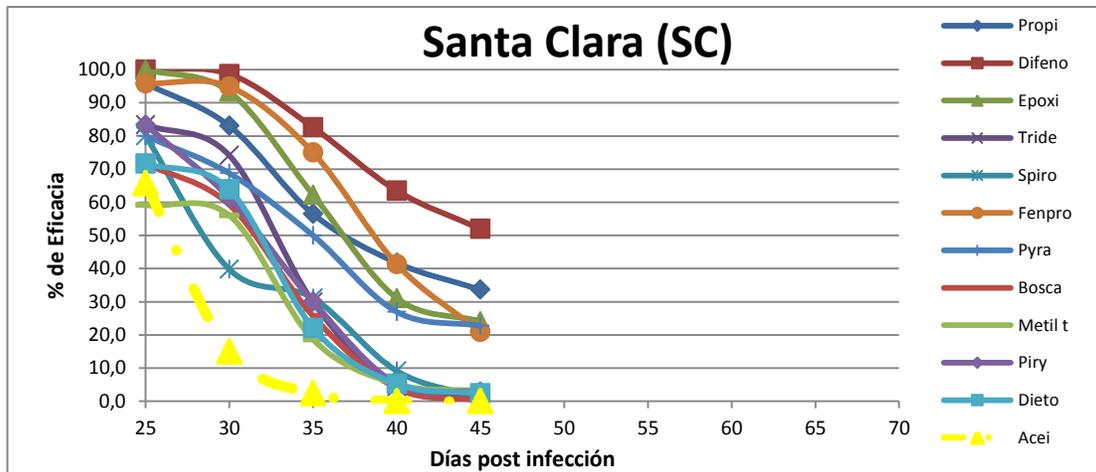


Figura 16. Comportamiento de la eficacia de los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 12 DPI, para cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015.

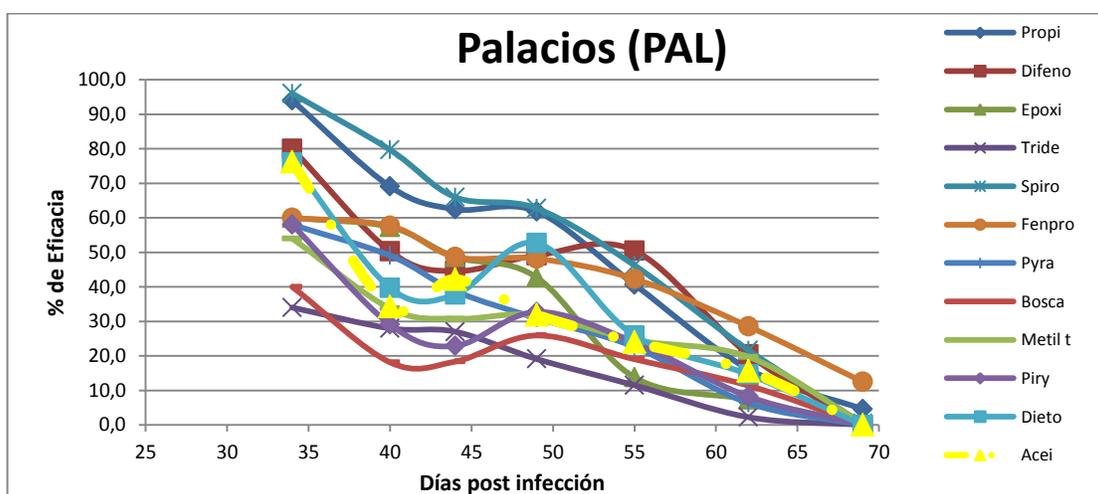
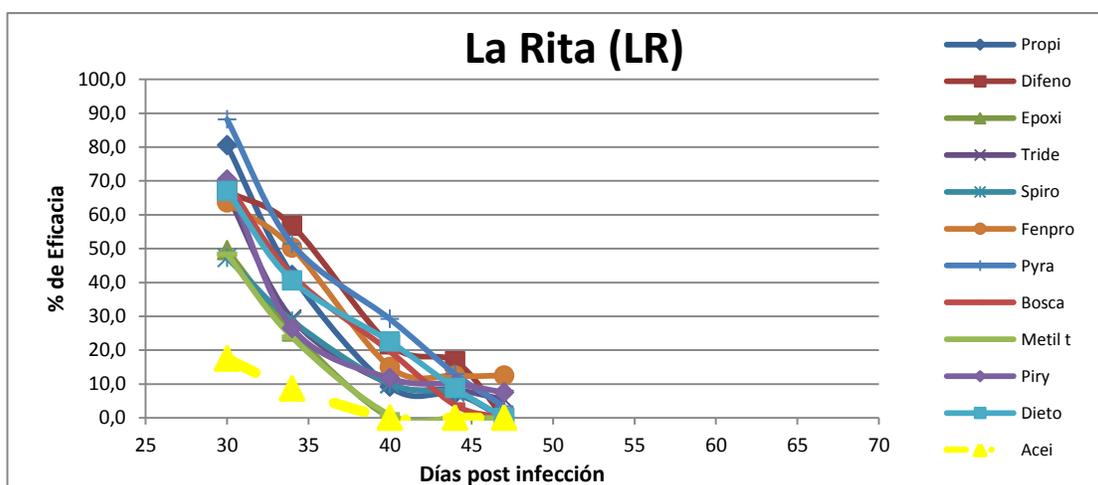
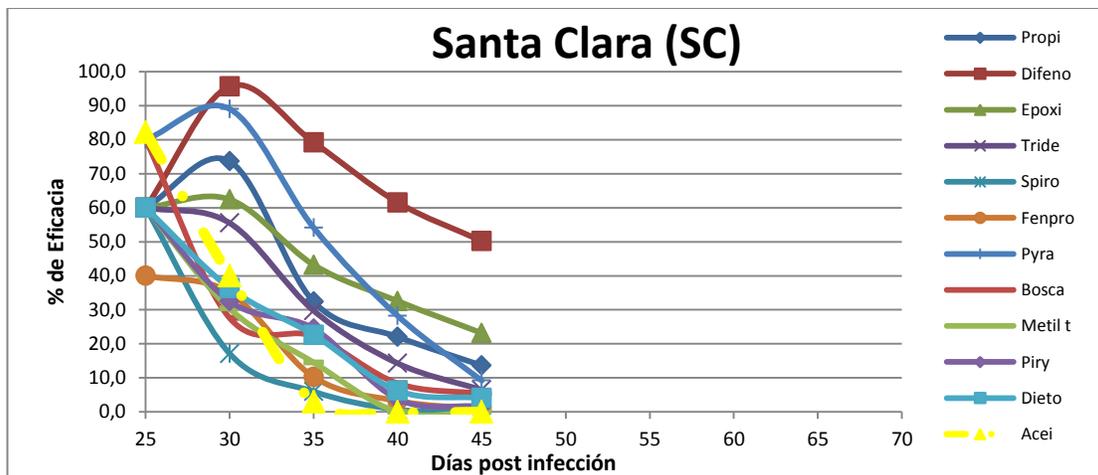


Figura 17. Comportamiento de la eficacia de los diferentes fungicidas sistémicos aplicados en 16 DPI, para cada una de las poblaciones evaluadas. Santa Clara (SC), La Rita (LR) y Palacios (PAL). CORBANA, 2015.

5. DISCUSIÓN

La pérdida de sensibilidad en las poblaciones de *M. fijiensis* de la zona bananera del Caribe de Costa Rica, a la mayoría de fungicidas sistémicos empleados en su combate, fue puesta en evidencia mediante los resultados de la presente investigación. Se detectó gran pérdida de sensibilidad a múltiples ingredientes activos (triazoles, aminas, estrobilurina, carboxamida, benzimidazol, anilinoimidazolinopirimidina y N-fenil carbamato), tanto en la población del patógeno presente en La Rita (LR) con menor historial de aplicaciones que en fincas comerciales (finca experimental), como en Palacios (PAL), una población expuesta a un amplio historial de aplicaciones (manejo de finca comercial), donde se ejerce una fuerte presión de selección sobre las poblaciones del patógeno.

Estos resultados concuerdan con los de Aguilar-Barragan *et al.* (2014) quienes determinaron las CE_{50} de algunos de los fungicidas empleados en el combate de la Sigatoka negra, mediante pruebas con aislamientos de campos sin historial de aplicaciones de fungicidas y otros con manejo intensivo del patógeno (más de 25 aplicaciones/año), con lo cual encontraron disminución de la sensibilidad en todos los ingredientes activos evaluados (azoxistrobina, carbendazim, propiconazole, vinclozolina, fludioxonil y mancozeb), y comprobaron al igual que Cañas-Gutiérrez *et al.* (2009), que la pérdida de sensibilidad del patógeno, estaba asociada al manejo intensivo con fungicidas en los campos bananeros.

Según los valores de CE_{50} para cada fungicida en las tres poblaciones no se aprecia exactamente el nivel de resistencia de las poblaciones de LR y PAL, sin embargo, al obtener un promedio de los valores de CE_{50} de todos los fungicidas en cada población y al realizar el cálculo del Factor de Resistencia (FR) este refleja las diferencias en sensibilidad causadas por la presión de selección ejercida sobre estas poblaciones. De esta manera, en la población de LR se encontró un factor de resistencia de 5,8 y en PAL de 8,5, con esto se catalogaron las

poblaciones por su nivel de resistencia como una población Ligermente resistente (LR) y una población Resistente (PAL).

Por otra parte, en la población de Santa Clara (SC; población silvestre) se presentaron porcentajes de inhibición inferiores que en la población de PAL y muy similares a los de LR para el epoxiconazole en todas las concentraciones evaluadas, donde el valor de CE_{50} solo fue menor que en la de PAL y también presentó porcentajes de inhibición ligeramente menores que en la población de LR para el pirymetanil en las dosis discriminates (0,01 y 0,1 mg L⁻¹), no obstante, los valores de CE_{50} no se determinaron con exactitud en estas poblaciones ($CE_{50} < 0,001$). El hecho que en la población silvestre se hayan encontrado porcentajes de inhibición del tubo germinativo menores, puede ser debido a la actividad intrínseca del fungicida con el patógeno, aunado a una mayor aptitud parasítica en esta población.

La pérdida de sensibilidad a los tres fungicidas triazoles evaluados en esta investigación varió en las tres poblaciones evaluadas, donde a las dosis discriminantes de 0,01 y 0,1 mg L⁻¹, para el propiconazole se presentó una pérdida de sensibilidad muy similar en las poblaciones de LR y PAL y para el difenoconazole se mostró mayor pérdida de sensibilidad en LR para la dosis de 0,01 mg L⁻¹ pero muy similar en LR y PAL para la dosis de 0,1 mg L⁻¹. Aunque se ha dicho que la población de LR ha sido menos expuesta a la presión de selección por fungicidas que la población de PAL, esta es una finca experimental de CORBANA S.A. y en ella se han realizado muchas aplicaciones de fungicidas en diversos experimentos, por lo que esta población ha tenido una presión de selección propia bastante fuerte, donde fungicidas triazoles y de otros grupos químicos han sido aplicados en múltiples ocasiones a lo largo de muchos años y aunque no tiene un manejo comercial, el desarrollo de resistencia a estos fungicidas ha quedado muy claro, e inclusive es mayor que en PAL para este grupo de fungicidas.

En el caso del epoxiconazole, la población de PAL mostró los porcentajes de inhibición más altos, superando inclusive a la población silvestre (SC) que

presentó resultados muy similares a los de LR, expresando en ambas poblaciones una ligera pérdida de sensibilidad a este ingrediente activo. Resultados similares a estos fueron obtenidos en un estudio llevado a cabo por Chávez (2012) en poblaciones de *M. fijiensis* de Ecuador, donde detectó una alta frecuencia de aislamientos resistentes al propiconazole pero no al epoxiconazole. No obstante, la eficacia de este fungicida fue muy baja en las tres poblaciones, incluso en la silvestre (SC), lo que podría ser debido a problemas de formulación del producto o de su solubilidad en agua, ya que que la preparación de la mezcla aplicada en el experimento se hizo con un volumen de agua mucho mayor (350 L ha^{-1}) con 5 L ha^{-1} de aceite mineral (relación 70:1 agua-aceite) en comparación con el utilizado en las aplicaciones comerciales (25 L ha^{-1}), las cuales son realizadas con una mayor proporción de aceite mineral en la mezcla total (hasta 15 L ha^{-1} ; relaciones 1:1; 2:1; 3:1 ó 4:1 agua - aceite).

El desarrollo de resistencia a los fungicidas triazoles en *M. fijiensis* ya había sido documentada por diversos autores (Calvo y Romero 1996; Romero y Sutton 1997 y 1998; Guzmán 2002; Marín *et al.* 2003; Pérez *et al.* 2003; Brent y Hollomon 2007; Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013) y también en muchos otros patógenos como *Monilinia fructicola* (Cox *et al.* 2006; Chen y Liu 2013), *Cercospora beticola* (Karaoglanidis *et al.* 2001 y 2003), *Mycosphaerella graminicola* (Leroux y Walker 2010; Stammler *et al.* 2011; Cools *et al.* 2012; Cools y Fraaije 2013), *Penicillium digitatum* (Sánchez-Torres y Tuset 2011), *Rhynchosporium secalis* (Kendall *et al.* 1993), *Venturia inaequalis* (Köller *et al.* 1997) y *Podosphaera fusca* (López-Ruiz *et al.* 2010), entre otros.

El alto nivel de resistencia al propiconazole en las poblaciones de LR y PAL era previsible, puesto que la pérdida de sensibilidad a este fungicida fue documentada desde hace muchos años por Romero y Sutton (1997). Estos autores asociaron este hecho, con el incremento en el número de aplicaciones de este fungicida, luego de que en 1992 la resistencia al benomil estuviera ampliamente distribuida en toda la zona bananera de Costa Rica y fuera retirado de los programas de manejo. Desde entonces y hasta hace pocos años, el

propiconazole siguió formando parte del manejo de la enfermedad, por lo que las aplicaciones de este ingrediente activo superan por mucho el número de los ciclos de aplicación que incorporan al difenoconazole y epoxiconazole, sin embargo, aunque el difenoconazole comenzó a utilizarse unos años más tarde, el nivel de resistencia presentado por las poblaciones del patógeno de LR y PAL también fue muy alto, lo que podría ser asociado a un fenómeno de resistencia cruzada positiva entre estos ingredientes activos.

Las diferencias en la actividad y eficacia encontradas entre estos fungicidas, probablemente obedecen a diferencias en la actividad tóxica intrínseca de cada uno de ellos con el patógeno y las propiedades físico químicas del ingrediente activo, como el coeficiente de partición octanol/agua (Pow) (Pérez 2006) que según Leroux y Walker (2010) por resultados obtenidos a partir de aislamientos de *M. graminicola*, observaron que a conforme aumenta el log Pow, los fungicidas parecen mostrar mayor actividad. De esta manera el mayor efecto es presentado por los triazoles más lipofílicos (log Pow: propiconazole=3,7; difenoconazole=4,3 y epoxiconazole=3,4) y encontraron que el difenoconazole tuvo una CE_{50} de $0,00025 \text{ mg L}^{-1}$, el epoxiconazole $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ y el propiconazole fue muy similar al anterior, resultados que coinciden con los obtenidos en esta investigación.

Estos fungicidas son inhibidores de la desmetilación (IDM), actúan sobre la enzima esteroles 14 α -demetilasa la cual es clave en la ruta de la biosíntesis del ergosterol, por lo que el agotamiento del mismo y la acumulación de precursores de esteroides metilados, afectan la integridad de la membrana y las proteínas unidas a ella, resultando en la inhibición del crecimiento de los hongos (Yan *et al.* 2011). Según Leroux y Walker (2010) y Cools y Fraaije (2013) la resistencia a DMI's está dada por alteraciones en el gen CYP51 que causan la disminución de la afinidad de los DMI's a su sitio de acción, la sobreexpresión del gen CYP51, resultando en altos niveles de esteroles 14 α -desmetilasa y una mayor expulsión activa del fungicida por medio transportadores de membrana (proteínas ATP vinculantes de cassette (ABC) o (MFS) la super familia facilitadora de transporte).

Cools y Fraaije (2013) mencionan que el mecanismo de resistencia más común es la alteración del sitio de acción y mencionan que la sustitución Y137F ha sido detectada en *M. graminicola* y otros patógenos incluyendo *M. fijiensis*. Además, observaron que aislamientos de *M. graminicola* con esta mutación en combinación con S524T mostraron menor sensibilidad a azoles que en los aislamientos que presentan solo Y137F. Según Chávez (2012) y Parker *et al.* (2014) otras mutaciones que confieren resistencia a fungicidas azoles en *M. fijiensis* y otros hongos comprenden (Y36F, A313G, Y461D, Y463D, Y463H, S463Y y Y463N) y por su parte Chávez (2012) encontró que estas mutaciones fueron ligadas con la resistencia al propiconazole, pero no así para el epoxiconazole en aislamientos resistentes de *M. fijiensis* obtenidos de poblaciones de Ecuador, situación que podría estarse presentando en las poblaciones estudiadas, que solo muestran una leve pérdida de sensibilidad al epoxiconazole en la población de LR y SC. Además, Leroux y Walker (2010) encontraron en aislamientos de *M. graminicola* las mutaciones G460D, Y661S/H, Y137F, V136A y Y161S/H, así como la eliminación del aminoácido Y461 o la doble eliminación de Y459 y G460. Cools y Fraaije (2013) también mencionan que en poblaciones modernas de *M. graminicola* resistentes a azoles y en muchos otros patógenos de plantas y humanos, es común encontrar las sustituciones Y459D, Y461H y Y461S.

Por otra parte, Cools *et al.* (2012) encontraron en aislamientos de *M. graminicola* un aumento en la expresión del gen CYP51 (10-40 veces en diferentes aislamientos) después de ser tratados con el fungicida epoxiconazole. El aumento en el nivel de transcripción de CYP51 conlleva a la sobreexpresión del mismo, provocando una disminución de la sensibilidad de fungicidas azoles en este caso al tebuconazole y epoxiconazole. Los mismos autores mencionan, que mecanismos de resistencia que no afectan el sitio específico de acción del fungicida como este, en combinación con las modificaciones en el gen CYP51, pueden conducir a la evolución de fenotipos que afecten fuertemente el rendimiento de los azoles en el campo, ya que tanto *in vitro* como en invernadero los aislamientos con este mecanismo de resistencia crecieron en concentraciones más altas de fungicidas.

Según Cools y Fraaije (2013) varios estudios en patógenos de plantas y humanos han revelado de manera similar que en *M. graminicola*, que el desarrollo de resistencia a azoles es de carácter poligénico, con múltiples mecanismos que contribuyen al fenotipo final y mencionan que el mayor flujo de salida de azoles mediado por la sobreexpresión de bombas de salida por medio de transportadores de membrana ABC y facilitadores MFS ha sugerido fenotipos resistentes a múltiples fungicidas en aislamientos de *M. graminicola*, basados en resultados obtenidos de estudios de resistencia cruzada.

El desarrollo de resistencia a los fungicidas triazoles en las poblaciones de LR y PAL debido a la fuerte presión de selección que ha sido ejercida en estas poblaciones, ha sido observado en esta investigación por presentar valores de CE_{50} superiores a la población silvestre (SC), así como una marcada pérdida de eficacia en las aplicaciones a nivel de campo en comparación con la misma. Sin embargo, la determinación del mecanismo o mecanismos implicados en este desarrollo de resistencia no puede determinarse con exactitud, por lo que estudios a nivel bioquímico y molecular deben ser realizados.

En el caso de los fungicidas pertenecientes al grupo de las aminas, se detectó una leve pérdida de sensibilidad para el tridemorph y más fuerte para la spiroxamina y fenpropimorph. El tridemorph presentó el mayor porcentaje de inhibición en la población de LR para la concentración de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ y las poblaciones de SC y PAL mostraron niveles de pérdida de sensibilidad muy similares, no obstante, a la concentración $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ la población silvestre (SC) mostró el mayor porcentaje de inhibición y las poblaciones de LR y PAL fueron en este caso las que presentan una ligera pérdida de sensibilidad en comparación con SC, también reflejado por los valores de CE_{50} . La spiroxamina, presentó un decrecimiento fuerte en su sensibilidad principalmente en la población de PAL y muy leve en LR en las dosis discriminantes evaluadas y para el fenpropimorph, en ambas poblaciones LR y PAL se encontró una fuerte pérdida de sensibilidad, siendo aún mayor en la población de LR a la dosis de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ y muy similar en ambas poblaciones a la dosis de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Esta pérdida de sensibilidad en las

poblaciones y el decrecimiento de la eficacia observada a nivel de campo, son indicativos del desarrollo de resistencia práctica o de campo en estas poblaciones.

Según Pérez (2006) el desarrollo de resistencia práctica a estos compuestos no había sido documentado anteriormente en áreas comerciales de banano. No obstante, Calvo y Romero (1996) detectaron una leve disminución en la sensibilidad del tridemorph a $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ en comparación con un testigo altamente sensible. Además, pocos años más tarde Guzmán (2002) y Marín *et al.* (2003) mencionan la detección de una evidente pérdida de sensibilidad a las aminas y alrededor de 12 años después, en la presente investigación se logró comprobar el desarrollo de resistencia en las poblaciones del patógeno, presentes en las plantaciones bananeras del Caribe Costarricense, provocado por la fuerte presión de selección ejercida sobre las poblaciones del hongo. Según lo que se puede observar con respecto a los valores de eficacia, el mayor nivel de resistencia fue presentado por el fenpropimorph, seguido de la spiroxamina y con niveles más bajos el tridemorph, lo que se puede apreciar de mejor manera en la población de LR y en menor medida en PAL. Aunque los valores de CE_{50} indican que la mayor pérdida de sensibilidad fue encontrada en PAL, en el campo la eficacia se vio mayormente afectada en LR, probablemente por una aptitud parasítica muy deteriorada en la población presente en PAL.

Pocos casos de resistencia a estos compuestos han sido documentados y según Fuchs y De Waard (1982) reportaron incrementos en el nivel de resistencia de *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* al tridemorph en experimentos de campo e invernadero, no obstante, esta resistencia no logró distribuirse debido al bajo grado de aptitud parasítica en los individuos resistentes. Brown *et al.* (1991) también detectaron ciertos niveles de resistencia en el mismo patógeno a los fungicidas tridemorph y fenpropimorph, sin embargo, el nivel de resistencia encontrado fue bajo, en relación al número de aplicaciones realizadas. Por otra parte, Leroux y Walker (2010) encontraron que aislamientos de *M. graminicola* resistentes a múltiples fungicidas, también mostraron una ligera reducción de sensibilidad al fenpropimorph.

Estos fungicidas pertenecen también al grupo de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE), sin embargo, actúan sobre otros procesos enzimáticos diferentes al afectado por los triazoles (IDM). Varios autores hacen referencia al mecanismo de acción de estos fungicidas y parece ser que difirieren un poco según sea el patógeno implicado. Kerkenaar *et al.* (1981) estudiaron el sitio de acción del tridemorph en *Ustilago maydis* y encontraron que la toxicidad de este ingrediente activo es causado por un efecto inhibitor específico de la enzima $\Delta 14$ -reductasa, responsable del doble enlace en la biosíntesis del ergosterol, mientras que Kerkenaar (1983), Baloch y Mercer (1987), Ziogas *et al.* (1991) y Debieu *et al.* (2000) determinaron en *Botrytis cinerea*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Nectria haematococca var cucurbitae* y *Microdochium nivale* la inhibición de la $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerasa.

Por otra parte, según Ziogas *et al.* (1991) el mecanismo de acción del fenpropimorph en *Nectria haematococca var cucurbitae*, indicó ser la inhibición de tres enzimas diferentes en la biosíntesis del ergosterol, la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, $\Delta 14$ -reductasa y escualeno epoxidasa. Baloch y Mercer (1987) coinciden en que este compuesto actúa sobre la $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerasa y la $\Delta 14$ -reductasa en *Saccharomyces cerevisiae* pero no en la escualeno epoxidasa. Con respecto a la spiroxamina, se ha logrado determinar que actúa principalmente inhibiendo la $\Delta 14$ -reductasa además de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ isomerasa y la escualeno epoxidasa (Pérez 2006). Debieu *et al.* (2000) también indicó para este compuesto en *Microdochium nivale* la inhibición de $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerasa como su mecanismo de acción.

Según Baloch y Mercer (1987) y Brent y Hollomon (2007) el doble sitio de acción predice un menor riesgo de desarrollo de resistencia hacia estos compuestos, no obstante, como ha sido revelado en esta investigación, el desarrollo de resistencia a las aminas es un hecho en *M. fijiensis*. Según Lasseron-De Falandre (1999) el mecanismo de resistencia al fenpropimorph en mutantes de *Nectria haematococca* fue reconocido como la sobreproducción de $\Delta 14$ -reductasa, mecanismo que podría también haberse desarrollado en *M. fijiensis*. Por otra parte según FRAC (2014b), estos fungicidas presentan

resistencia cruzada entre sí, lo que parece ser muy evidente en este caso, ya que el desarrollo de resistencia a las tres aminos evaluadas pudo ser comprobado. El mecanismo de resistencia ya mencionado para el fenpropimorph podría provocar la pérdida de sensibilidad en estos fungicidas, ya que en los tres ingredientes activos la inhibición de la $\Delta 14$ -reductasa forma parte de su mecanismo de acción.

Según Georgopoulos (1982c) en general los inhibidores de biosíntesis del ergosterol incluyendo triazoles, imidazoles y aminos están correlacionados positivamente para la resistencia cruzada y aunque existen diferencias en sus estructuras químicas, la semejanza en sus mecanismos de acción explica que una sola mutación podría afectar la sensibilidad de todos esos inhibidores, si el desarrollo de resistencia es el resultado de una modificación en el sitio de acción del fungicida. No obstante, si este mecanismo de resistencia no causó la pérdida de sensibilidad, podría estar relacionado con otro mecanismo como lo es el transporte de membrana, mecanismo que ha sido propuesto para varios fungicidas de este grupo (Palani y Lalithakumari 1999; Cox *et al.* 2006; Leroux y Walker 2010; Cools *et al.* 2012; Cools y Fraaije 2013) y para la resistencia a múltiples fungicidas no relacionados. Estudios bioquímicos y moleculares que revelen a fondo el mecanismo o mecanismos de resistencia que afectan la sensibilidad de *M. fijiensis* a los fungicidas de este grupo son necesarios para comprender de una mejor manera este fenómeno.

Otro caso corresponde a los fungicidas pertenecientes al grupo de las estrobilurinas, los cuales han sido utilizados en el combate de la Sigatoka negra desde hace ya muchos años. El primer ingrediente activo utilizado de este grupo fue el azoxistrobin en 1997, el cual presentó los primeros indicios de resistencia luego de 25 ciclos de aplicación, poco tiempo después fue incorporado el trifloxistrobin en el 2002 y por último el pyraclostrobin que formó parte del manejo de la Sigatoka a partir del 2003 (Guzmán 2007).

En este estudio se evaluó el desempeño del pyraclostrobin, donde las pruebas de sensibilidad *in vitro* realizadas en las tres poblaciones arrojaron valores de $CE_{50} < 0,001 \text{ mg L}^{-1}$ para todas SC, LR y PAL, por lo que el nivel de pérdida de

sensibilidad no pudo ser determinado con exactitud. No obstante, los porcentajes de inhibición en las dosis discriminantes fueron menores en las poblaciones de LR y PAL que en la silvestre (SC) y mediante las pruebas realizadas en campo se pudo observar una gran pérdida de eficacia en las poblaciones de LR y PAL en comparación con la eficacia obtenida en SC, lo que indica que aunque la pérdida de sensibilidad no pudo ser definida con precisión, hay un claro desarrollo de resistencia en las poblaciones del patógeno que han sido expuestas a presión de selección por el uso de estos fungicidas. Este no es un fenómeno desconocido, puesto que el desarrollo de resistencia a las estrobilurinas ya había sido documentado por varios autores en *M. fijiensis* (Guzmán 2002; Marín *et al.* 2003; Amil *et al.* 2007 Ganry *et al.* 2012; Guzmán *et al.* 2013) y otros patógenos como *Erysiphe necator* (Taksonyi *et al.* 2013; Rallos *et al.* 2014), *Monilinia fructicola* (Amiri *et al.* 2010), *Mycosphaerella graminicola* (Fraaije *et al.* 2005; McCartney *et al.* 2007), *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* (Sierotzki *et al.* 2000), *Pyricularia grisea* (Kim *et al.* 2003), *Alternaria solani* (Pasche *et al.* 2004; Fairchild *et al.* 2013), *Alternaria alternata* (Fairchild *et al.* 2013) y *Botrytis cinerea* (Bardas *et al.* 2010; Kim y Xiao 2010; 2011).

Amil *et al.* (2007) estudiaron la dinámica de la resistencia de *M. fijiensis* a las estrobilurinas desde el año 2000 al 2003 y con ello encontraron que la resistencia a estos fungicidas estaba ampliamente distribuida en toda la zona del Caribe de Costa Rica. Además determinaron que la dispersión de esporas por efecto del viento era la principal causa de la homogenización de la resistencia a estos compuestos, la cual se mostró muy estabilizada. Según Fraaije *et al.* (2005) este mismo comportamiento fue detectado en *Mycosphaerella graminicola*, donde la dispersión aérea de las esporas de este patógeno también se encargó de la propagación de individuos resistentes en las poblaciones. Es por ello que actualmente la resistencia a estos fungicidas prevalece en las poblaciones del patógeno y tanto en LR como PAL la eficacia de los mismos se vio muy deteriorada en niveles similares.

Según Fernández-Ortuño *et al.* (2008) y Parvatha (2013) los fungicidas Qols inhiben la respiración mitocondrial del hongo, al unirse específicamente al sitio Qo (sitio exterior de la oxidación quinol) del complejo enzimático del citocromo bc1 (complejo III), bloqueando la transferencia de electrones y por ende la detención de la producción de ATP.

Según Fernández-Ortuño *et al.* (2008) el mecanismo más común para el desarrollo de resistencia a estos fungicidas corresponde a mutaciones en el citocromo b de la mitocondria. Las mutaciones encontradas han sido cambios en la secuencia de aminoácidos, glicina por alanina en la posición 143 (G143A), fenilalanina por leucina en la posición 129 (F129L) y recientemente se ha detectado el cambio de glicina a arginina en la posición 137 (G137R) también relacionado con la resistencia a Qols. Según estos autores, los aislamientos que llevan las sustituciones F129L o G137R confieren una resistencia moderada, mientras los que lleven la mutación G143A expresan una alta resistencia a estos fungicidas. Fernández-Ortuño *et al.* (2008) y Amil *et al.* (2007) comprobaron que la resistencia a Qols en *M. fijiensis* está dada por la mutación G143A, al igual que en *M. graminicola* (Fraaije *et al.* 2005), *Podosphaera fusca*, *Pseudoperonospora cubensis* (Ishii *et al.* 2001), *Erysiphe necator* (Rallos *et al.* 2014), *Botrytis cinerea* (Bardas *et al.* 2010) y *Pyricularia grisea* en el cual también se detectó la mutación F129L (Kim *et al.* 2003). Además Kim *et al.* (2003) encontraron un alto grado de resistencia cruzada entre los fungicidas azoxistrobina y trifloxistrobin en los aislamientos que presentaron G143A, similar a lo encontrado por Pasche *et al.* (2004) en aislamientos resistentes de *Alternaria solani*, donde se encontró una fuerte correlación para resistencia cruzada entre azoxistrobina y pyraclostrobin y un poco menor con trifloxistrobin. Como en *M. fijiensis* la resistencia también está dada por la mutación G143A, es muy probable que la resistencia cruzada entre fungicidas de este grupo sea un hecho y que la resistencia al pyraclostrobin sea un efecto de la acumulación de resistencia en las poblaciones, desde la pérdida de sensibilidad detectada al azoxistrobin en el año 2000, aunado a la presión de selección generada por las numerosas aplicaciones de pyraclostrobin en los campos bananeros.

El boscalid es un fungicida perteneciente al grupo de las carboxamidas, este ha sido utilizado comúnmente en los programas de manejo de *M. fijiensis* y al cual también fue detectada la pérdida de sensibilidad por parte del patógeno. Los resultados obtenidos mediante los análisis de sensibilidad *in vitro* indicaron una mayor pérdida de sensibilidad en la población de LR ($CE_{50} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$), mientras que en PAL el valor de CE_{50} no pudo ser determinado con exactitud ($CE_{50} = <0,001 \text{ mg L}^{-1}$), lo mismo que en SC. Con estos resultados y los obtenidos en campo para la eficacia, pudo apreciarse el desarrollo de resistencia de campo, mayormente en la población de LR, en la cual la eficacia del fungicida disminuyó en gran medida al compararse con los resultados de eficacia de este fungicida en la población silvestre (SC) y más leve en la población de PAL. En este patógeno ya se había detectado una evidente pérdida de sensibilidad a las carboxamidas (Guzmán *et al.* 2013), sin embargo, en esta investigación se muestra que esta pérdida de sensibilidad se ha convertido en resistencia de campo en las poblaciones del patógeno. Hallazgos de resistencia a este compuesto también fueron puestos en evidencia por Avenot y Michailides (2007), quienes encontraron aislamientos de *Alternaria alternata* altamente resistentes al boscalid, y al igual que en este caso, procedían de huertos tratados con este fungicida. Además para entonces indicaron que este era el primer hallazgo de resistencia a este ingrediente activo. Bardas *et al.* (2010), Kim y Xiao (2010; 2011) y Fairchild *et al.* (2013) también encontraron aislamientos de *A. alternata* y *Alternaria solani*, con un alto grado de resistencia al boscalid, así como Veloukas *et al.* (2011) y Konstantinou *et al.* (2015) hallaron aislamientos de *Botrytis cinerea* resistentes a este compuesto. Por su parte Amiri *et al.* (2010) detectaron una disminución en la sensibilidad de *Monilinia fructicola*, y Miyamoto *et al.* (2009) encontraron aislamientos moderada y altamente resistentes de *Corynespora cassiicola* a este compuesto.

Según Veloukas *et al.* (2011) el mecanismo de acción del boscalid y otros fungicidas de este grupo, consiste en la inhibición del complejo II en la cadena respiratoria mitocondrial, conocido también como succinato quinona oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa (SDH). Los mismos autores

mencionan que esta enzima juega un papel clave en el ciclo del ácido tricarboxílico y la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial, por lo que su inhibición conduce a un bloqueo de la producción de energía celular y según Veloukas *et al.* (2011), Fraaije *et al.* (2012) y Konstantinou *et al.* (2015) la resistencia al boscalid en aislamientos de *M. graminicola* y *B. cinerea* ha sido asociada con mutaciones que conllevan a la sustitución de diferentes aminoácidos en las subunidades SDHB, SDHC y SDHD.

Para la subunidad SDHB Fraaije *et al.* (2012) encontraron en aislamientos de *M. graminicola*, la sustitución lisina por arginina en la posición 48 (K148R), cisteína por arginina en 276 (C276R), prolina por serina en la posición 51 (P51S), valina por isoleucina en la posición 29 (V29I) y glicina por arginina en la posición 54 (G54R). Además encontraron dos sustituciones en la subunidad SDHC, ambas de asparagina por treonina en los codones 33 y 34 (N33T y N34T) y en la subunidad SDHD encontraron la sustitución glicina por alanina en la posición 10 (G10A) y prolina por arginina en la posición 47 (P47R).

Por otra parte, Veloukas *et al.* (2011) y Konstantinou *et al.* (2015) encontraron varias mutaciones asociadas con el desarrollo de resistencia en *Botrytis cinerea*, todas fueron encontradas en la subunidad SDHB, y corresponden a la sustitución de asparagina por isoleucina en el codón 230 (N230I), histidina a arginina en la posición 272 (H272R) y de histidina por tirosina en la misma posición (H272Y), así como la sustitución de histidina por leucina también en el codón 272 (H272L) y prolina por fenilalanina en el codón 225 (P225F). Además ambos autores determinaron que la mutación H272R fue predominante, mientras que las demás se detectaron con baja frecuencia. Por su parte Konstantinou *et al.* (2015) determinaron que la sustitución H272L y P225F se presentaron raramente y solo fueron encontradas en una población, sin embargo, estas se asociaron a niveles más altos de resistencia a este fungicida.

Este es el primer hallazgo de resistencia al boscalid reportado en *M. fijiensis*, por lo que el mecanismo de resistencia en este patógeno no ha sido identificado. Estudios a nivel molecular deben ser llevados a cabo para determinar claramente,

si el desarrollo de resistencia a este fungicida está influenciado por mutaciones puntuales en alguna de las subunidades SDH como las reportadas para otros patógenos o si otro mecanismo de resistencia se encuentra involucrado.

Otro fungicida evaluado fue el metil tiofanato perteneciente al grupo de los benzimidazoles. La pérdida de sensibilidad *in vitro* para este fungicida fue muy evidente en las poblaciones de LR y PAL en niveles muy similares, al ser comparadas con la población silvestre (SC; $CE_{50} = 0,002 \text{ mg L}^{-1}$), con $CE_{50} = 0,0126 \text{ mg L}^{-1}$ para LR y $CE_{50} = 0,0135 \text{ mg L}^{-1}$ para PAL. La pérdida de sensibilidad, al igual que la marcada pérdida de eficacia observada en campo, comprueba el desarrollo de resistencia en estas poblaciones. La mayor pérdida de eficacia fue observada en la población de LR, mientras que en PAL a pesar de presentar el valor de CE_{50} más alto, la pérdida de eficacia fue menos marcada. Las poblaciones de SC y LR mostraron en general mayor agresividad y una evolución muy rápida de los síntomas de la enfermedad que en PAL, en la cual este proceso fue muy lento. Este hecho puede ser debido como se ha mencionado anteriormente a una débil aptitud parasítica en esta población, debido al desarrollo de resistencia a la mayoría de fungicidas utilizados en su combate, que han provocado muchos cambios en su genética y a pesar de que los individuos resistentes se recuperan y logran concluir su ciclo de vida, la aptitud parasítica de esta población se ha visto muy deteriorada.

El desarrollo de resistencia al benomil, primer benzimidazol utilizado en el combate de *M. fijiensis* fue reportado desde la década de 1970 (Stover 1980) y en Costa Rica la resistencia a este compuesto fue documentada en el año 1991 (Guzmán 2003b). Actualmente la resistencia en *M. fijiensis* ha sido detectada para la carbendazina (Aguilar-Barragan *et al.* 2014) y según los resultados de esta investigación, también para el metil tiofanato. El desarrollo de resistencia a benzimidazoles igualmente ha sido reportado en otros patógenos. Chen y Liu (2013) detectaron la aparición de cepas resistentes de *Monilinia fructicola* al metil tiofanato, Derpmann (2013) observó aislamientos de *Botrytis cinerea* con la misma condición, además, Myresiotis *et al.* (2007) y Sun *et al.* (2010) encontraron

aislamientos del mismo patógeno resistentes a la carbendazina, Sánchez-Torres y Tuset (2011) encontraron aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes al thiabendazol y Khilare y Gangawane (2001) al metil tiofanato, lo mismo observado por Suga *et al.* (2011) en aislamientos de *Fusarium asiaticum*, así como en aislamientos de *Venturia inaequalis* por Chapman *et al.* (2011).

Los fungicidas benzimidazoles actúan bloqueando la formación de microtúbulos al unirse selectivamente con las β -tubulinas fúngicas, lo que impide el acoplamiento de los diámetros de α y β -tubulinas interfiriendo en la mitosis celular (Pérez 2006). Es por esto que el mecanismo de resistencia que ha sido asociado a estos fungicidas involucra mutaciones en la β -tubulina. En *M. fijiensis* Aguilar-Barragan *et al.* (2014), realizaron un análisis molecular para la β -tubulina en aislamientos resistentes a la carbendazina y encontraron una mutación en el codón 198. Chen y Liu (2013) asociaron el desarrollo de resistencia al metil tiofanato en *Monilinia fructicola* a mutaciones puntuales en el gen de la β -tubulina en las posiciones 198 y 200 (E198A, E198Q y F200Y) y en *Penicillium digitatum* el desarrollo de resistencia fue atribuido a la mutación (F200Y) (Sánchez-Torres y Tuset 2011). Para *Fusarium asiaticum* las mutaciones encontradas en aislamientos resistentes fueron sustituciones de fenilalanina por tirosina en dos sitios distintos (F167Y y F200Y) sin embargo, la segunda fue más predominante (Suga *et al.* 2011).

Los niveles de resistencia encontrados para este fungicida son relativamente bajos a pesar de que la resistencia al benomil estaba ampliamente distribuida en la zona bananera desde mediados de la década de los 90 (Romero y Sutton 1998) y sumamente estable aun en ausencia de aplicaciones del fungicida por largos periodos de tiempo. Además de esto, según FRAC (2014b) todos los benzimidazoles presentan resistencia cruzada, por lo que los altos niveles de resistencia que mostraban las poblaciones de *M. fijiensis* al benomil, teóricamente deberían verse reflejados igualmente para el metil tiofanato, sin embargo, no lo es así, presentando niveles bajos de resistencia en las poblaciones evaluadas.

Por otra parte, se evaluó el fungicida pirymetanol (anilino pirimidina), al cual solo se determinó la pérdida de sensibilidad para la población presente en PAL ($CE_{50} = 0,103 \text{ mg L}^{-1}$), mientras que en SC y LR el valor de CE_{50} fue $< 0,001 \text{ mg L}^{-1}$, lo que confirma en mayor medida que la pérdida de sensibilidad está influenciado por el uso intensivo de los fungicidas. Inclusive la población de LR presentó porcentajes de inhibición ligeramente superiores que los presentados por la población silvestre (SC) en las dosis discriminantes. Esto puede deberse al igual que en el epoxiconazole, a la actividad tóxica intrínseca del fungicida con el hongo, la variabilidad genética en las poblaciones y una menor aptitud parasítica de los individuos resistentes.

Esta pérdida de sensibilidad *in vitro* en la población de PAL no está muy correlacionada con la pérdida de eficacia en campo, ya que este fungicida no mostró resultados muy satisfactorios ni siquiera en la población silvestre (SC) y en LR aunque se presentaron los mayores porcentajes de inhibición, fue en la población donde se presentó menor eficacia. Estos datos no reflejan un desarrollo de resistencia como tal, sin embargo, en la población de PAL si se presenta una evidente pérdida de sensibilidad. No obstante, el riesgo de desarrollo sigue latente, dado que el tipo de resistencia en este fungicida es progresiva (paso a paso) y el monitoreo continuo de la sensibilidad es necesario para detectar a tiempo este fenómeno. Aunque la resistencia a este fungicida no ha sido documentada en *M. fijiensis*, en otros patógenos ya ha sido observada, como en *Botrytis cinerea* (Chapeland *et al.* 1999; Latorre *et al.* 2002, Sun *et al.* 2010; Latorre y Torres 2012; Konstantinou *et al.* 2015) y en algunos aislamientos de *Alternaria solani* y *A. alternata* (Fairchild *et al.* 2013).

Chapeland *et al.* (1999) aunque no pudieron explicar con toda certeza el mecanismo de resistencia a este fungicida, lograron observar una reducida acumulación del fungicida en el micelio del hongo, por lo que sugieren que el mecanismo de resistencia hacia este compuesto está relacionado con un fuerte flujo de salida del fungicida de las células del patógeno.

El último fungicida evaluado fue el dietofencarb, perteneciente al grupo de los N-fenil carbamatos. Los porcentajes de inhibición fueron muy similares en las poblaciones de LR y PAL, lo mismo que los valores de CE_{50} (0,04 y 0,035 mg L⁻¹) respectivamente. Esta pérdida de sensibilidad al compararse con la población silvestre (SC; CE_{50} = 0,007 mg L⁻¹) aunado a una ligera pérdida de eficacia, son indicios de un leve desarrollo de resistencia en las poblaciones de LR y PAL a este ingrediente activo.

El desarrollo de resistencia a este compuesto no había sido observado en *M. fijiensis*, sin embargo, los resultados de esta investigación así lo demuestran. En pocos estudios realizados con otros patógenos se ha encontrado resistencia a este fungicida. Sun *et al.* (2010) encontraron un alto porcentaje de aislamientos de *Botrytis cinerea* resistentes al dietofencarb y Suga *et al.* (2011) encontraron cepas de *Fusarium asiaticum* resistentes a este compuesto. Además Leroux y Walker (2010) encontraron aislamientos de *M. graminicola* resistentes a múltiples fungicidas que también evidenciaron un decrecimiento en la sensibilidad al dietofencarb.

Alvarez (1991) y Pappas (1997) determinaron que el dietofencarb muestra resistencia cruzada negativa con los benzimidazoles. Estos autores encontraron que aislamientos de *Botrytis cinerea* altamente resistentes a benzimidazoles, mostraron resistencia cruzada negativa al dietofencarb. De esta manera, aislamientos que se mostraron altamente sensibles a benzimidazoles se mostraron insensibles al dietofencarb y viceversa. Sin embargo, este comportamiento no fue observado en *M. fijiensis* y los valores de CE_{50} fueron similares en ambos fungicidas (benzimidazol y N-fenil carbamato).

Según FRAC (2014b) el mecanismo de acción de este compuesto es el mismo que el de los benzimidazoles, los cuales actúan bloqueando la formación de microtúbulos al unirse selectivamente con las β -tubulinas fúngicas, lo que impide el acoplamiento de los diámetros de α y β -tubulinas interfiriendo en la mitosis celular (Pérez 2006). El mecanismo de resistencia a este fungicida no ha sido estudiado, pero al igual que en los benzimidazoles podría estar relacionado con

las β -tubulinas fúngicas ya que en este punto específico es donde actúa el fungicida. Estudios que revelen el mecanismo de resistencia hacia este fungicida, deben realizarse con el fin de comprender mejor este fenómeno.

El desarrollo de resistencia en *M. fijiensis* a fungicidas con diferentes mecanismos de acción (triazoles, anilinas, estrobilurina, carboxamida, benzimidazol y N-fenil carbamato) podría ser catalogado como un fenómeno de resistencia múltiple (MDR), como también ha sido indicado para *Botrytis cinerea* por diversos autores (Myresiotis *et al.* 2007; Konstantinou *et al.* 2015), *Mycosphaerella graminicola* (Cools y Fraaije 2013) y *Venturia inaequalis* (Chapman *et al.* 2011; Latorre y Torres 2012), sin embargo se necesitan estudios más detallados utilizando un mismo aislamiento para comprobar esta hipótesis.

Según Myresiotis *et al.* (2007); Kretschmer *et al.* (2009), Leroux y Walker (2010) y Konstantinou *et al.* (2015) el mecanismo planteado para la resistencia múltiple está relacionado a una disminución de la acumulación de los fungicidas en el micelio del hongo, por la sobreproducción de transportadores de salida en la membrana plasmática, como lo son las proteínas ABC (ATP vinculantes de cassette) y MFS (la super familia facilitadora de transporte). Según Leroux y Walker (2010) los transportadores ABC hidrolizan ATP y utilizan la energía generada para transportar una amplia variedad de compuestos y los transportadores MFS son más pequeños y hacen uso de una gradiente de protones generada a través de la membrana plasmática para la traslocación del sustrato.

Este mecanismo de resistencia podría haberse desarrollado en *Mycosphaerella fijiensis*, dado que los resultados de este estudio lograron comprobar tanto con pruebas *in vitro* como *in vivo* el desarrollo de resistencia de este patógeno a la mayoría de fungicidas sistémicos empleados en su combate. Lo que indica que el problema de resistencia es más complejo que solo mutaciones asociadas con la pérdida de sensibilidad a un fungicida específico, si no que más de un mecanismo de resistencia está implicado y cada uno contribuye al fenotipo final. No obstante, se necesita de estudios detallados a nivel bioquímico y molecular, que comprueben esta teoría para *M. fijiensis*.

Por otra parte, los resultados obtenidos en las pruebas de campo indicaron la importancia de realizar las aplicaciones de fungicidas pocos días después de que se ha iniciado la infección del tejido. En este caso, los tratamientos aplicados a los 8 DPI mostraron mayor efecto que los aplicados en 12 y 16 DPI en todas las variables evaluadas. Esto se debe a que los fungicidas tienen mayor efecto curativo, cuando son aplicados en el tejido recientemente infectado, inhibiendo la germinación y crecimiento de las esporas de *M. fijiensis*, provocando conjuntamente mayor impacto en el letargo del desarrollo de lesiones con capacidad esporulante (estadio 6 de los síntomas según escala de Fouré 1985), ya que según Guzmán (2015)¹ esto está relacionado a que las aplicaciones tempranas, en este caso 8 DPI, actúan sobre menor cantidad de micelio (tubos germinativos dentro de la hoja) que en aplicaciones más tardías (12 y 16 DPI), donde el hongo se ha extendido mayormente y ha desarrollado una mayor masa micelial en el interior de la hoja, por lo que la cantidad de fungicida que logra penetrar en el tejido foliar tiene menor capacidad para combatir el patógeno. El mismo comportamiento se presenta en las aplicaciones realizadas para el control de *Venturia inaequalis* que según Beckerman *et al.* (2015) las aplicaciones llevadas a cabo de 4 - 5,5 días después de la infección no lograban impedir el establecimiento del patógeno y por ello los niveles de infección aumentaron en 77 y 15 veces para dos diferentes variedades donde las aplicaciones se realizaron a los 4 días (96 h) en comparación con aplicaciones realizadas a los 3 DPI (72 h). Además mencionan que la aparición de los primeros síntomas también fue significativamente mayor en las aplicaciones de 4 DPI con aplicaciones de diferentes DMI's. Estos autores además indican que las aplicaciones de fungicidas a intervalos de 7 días, proporcionan mejores resultados que los aplicados a 14 días. Con estos resultados los autores llegaron a la conclusión de que las aplicaciones de fungicidas en este patógeno deben ser llevadas a cabo cada 72 h y a dosis completas para prevenir inclusive la aparición de síntomas.

¹Guzmán, M. 2015. Eficacia de los fungicidas sistémicos utilizados en el combate de la Sigatoka negra. Comunicación Personal. CORBANA S.A. Correo electrónico: mguzman@corbana.co.cr

En relación a lo anterior, los diferentes estados de desarrollo de las candelas (según escala de Brun 1963) donde se aplicaron los tratamientos, también tuvieron un efecto significativo sobre los tratamientos, en todas las variables evaluadas, PI, PE4, PL, evolución de la severidad (% de necrosis) y eficacia (% de eficacia en base al testigo relativo). Así, los tratamientos aplicados en candelas de menor desarrollo (0-6) presentaron mejores resultados en todas las variables, en comparación con los aplicados en candelas de mayor desarrollo (8), en las cuales habían transcurrido mayor número de días luego de la infección, ya que según Cervantes (1995), la hoja candela está expuesta a ser infectada desde que inicia su apertura (estadios 0-2). Incluso en SC se pudo observar cuando se aplicaron los tratamientos correspondientes a 16 DPI, que en algunas plantas con candela en grado 8 (marcado el día de la infección) ya se observaban los primeros síntomas de la enfermedad (PI) en el área de evaluación.

Los PI, PE4 y PL presentaron diferencias entre tratamientos y entre las diferentes poblaciones de *M. fijiensis*. Para los PI, los triazoles presentaron mejores resultados en la población de LR, las aminos y la estrobilurina en PAL, la carboxamida en LR, el benzimidazol en PAL, la anilino pirimidina en LR y el N-fenil carbamato en PAL. En el caso de los PE4, todos los tratamientos fueron superiores en la población de PAL, mientras que para el PL, los triazoles tuvieron mejor efecto en SC sin diferencias en el propiconazoles con PAL (0,2 días), las aminos tuvieron mejor efecto en PAL, sin diferencias en el tridemorph con SC (0,4 días), la estrobilurina presentó un PL más extenso en SC y los demás tratamientos (carboxamida, benzimidazol, anilino pirimidina y N-fenil carbamato) presentaron PL más extensos en PAL. Sin embargo, las diferencias para el PL entre la población silvestre (SC) y PAL (catolagada como resistente) fueron de poca magnitud, no obstante, las diferencias con LR (considera como ligeramente resistente), fueron muy marcadas.

Para todos los fungicidas los PI fueron más cortos en la población silvestre (SC), los días que tardaron en aparecer las primeras manchas (PE4; estado de

transición entre los PI y PL), fueron mucho mayores en PAL y similares en LR y SC, mientras que los PL fueron similares en PAL y SC y menores en LR. Estas diferencias pueden estar asociadas a factores ambientales como la HR, la temperatura y la precipitación, como ha sido demostrado en varios estudios de campo (Gauhl 1994, Cervantes 1995) donde la aparición de los primeros síntomas y el desarrollo de los mismos se ven favorecido por condiciones de alta precipitación, alta HR y temperatura que supere los 20 °C. Sin embargo, las condiciones ambientales fueron similares en todas las parcelas experimentales, excepto que en PAL se presentaron 5 días sin precipitación luego de la primera aplicación de tratamientos (8 DPI), no obstante, el promedio de precipitación mensual supera a los de LR y SC, siendo el menor en SC (Anexo 3). Esto sugiere que las condiciones ambientales, aunque tienen mucha influencia sobre el desarrollo del patógeno, no fueron tan determinantes en los resultados obtenidos y que más bien podría estar asociado a un costo de aptitud parasítica “fitness” en las poblaciones de LR y PAL, las cuales mostraron resistencia a la mayoría de fungicidas empleados en su control. De esta manera, la pérdida de sensibilidad en estas poblaciones pudo haber causado la pérdida de adaptabilidad y de agresividad en estas poblaciones, y aunque los individuos resistentes logran sobrevivir al efecto de los fungicidas y causar infección, se desarrollan con menor rapidez que la población silvestre.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Cox *et al.* (2006) quienes compararon algunos parámetros de aptitud “fitness” en aislamientos de *Monilinia fructicola* sensibles y resistentes al propiconazole, y encontraron que el periodo de incubación fue significativamente más corto en los aislados sensibles que en los resistentes, además tuvieron mayores porcentajes de germinación y mayor producción de esporas, pero no mostraron diferencias significativas en el periodo de latencia.

Además, Fuchs y De Waard (1982) mencionan que la resistencia a los fungicidas inhibidores de biosíntesis del ergosterol (6 de 11 fungicidas evaluados), es acompañada generalmente por un decrecimiento en el aptitud parasítica

“fitness” o patogenicidad, comprobado en experimentos con aislamientos de *Cladosporium cucumerinum* sensibles y resistentes al triarimol y triforine, donde el grado de resistencia fue inversamente proporcional a la patogenicidad y mutantes de *Aspergillus nidulans* presentaron diferentes grados de reducción de aptitud parasítica “fitness” con respecto a la germinación de esporas, elongación del tubo germinativo, crecimiento micelial y esporulación. Por su parte Bardas *et al.* (2008), también detectaron diferencias de aptitud parasítica “fitness” en aislamientos sensibles y resistentes de *Botrytis cinerea* a las anilinopyrimidinas, observando en los aislamientos sensibles, un crecimiento micelial significativamente mayor que en los resistentes.

Por otra parte, como se pudo observar en esta investigación, la población silvestre (SC) fue muy agresiva, presentando una tendencia en el aumento de la severidad muy acelerada, similar en la población ligeramente resistente (LR), pero contrario a la población resistente (PAL) la cual mostró una agresividad mucho menor, con un incremento muy leve en el desarrollo de los síntomas, demorando 24 días más que la población silvestre y 22 días más que la población ligeramente resistente, en alcanzar el 100% de necrosis en los testigos. Dejando de lado las diferencias ambientales entre los sitios de estudio, esto parece evidenciar una pérdida de agresividad en esta población, lo cual está muy relacionado con lo mencionado por Narayanasamy (2011) quien afirma que la variabilidad genética en los patógenos, influye en la variación de características como la habilidad para infectar a su hospedero y potencial patogénico y que además, la presión de selección y la aparición de genes de resistencia por el uso frecuente de fungicidas, pueden alterar la virulencia o agresividad del patógeno y la tolerancia a los mismos.

Además, las diferencias en eficacia de los fungicidas evaluados, se deben en parte a los diferentes niveles de pérdida de sensibilidad a cada uno de ellos, así como a características de absorción y translocación de los diferentes ingredientes activos, y sus propiedades fungicidas. Según Pérez (2006), esto depende en gran medida de su lipofilia y solubilidad en agua. El mismo autor menciona que la

lipofilia permite la penetración a nivel de las capas cerosas y la cutícula del tejido foliar y que la traslocación sistémica, está muy determinada por la solubilidad en agua. En este experimento los fungicidas fueron aplicados en emulsión agua-aceite (relación 70:1), sin embargo, el volumen de agua utilizada fue mucho mayor que el utilizado en aplicaciones comerciales, en las que se utiliza una mayor proporción de aceite mineral en la mezcla total (relación 1:1; 2:1; 3:1 ó 4:1 agua-aceite). De esta forma el tipo de formulación de cada ingrediente activo y su solubilidad en agua pudo haber afectado la eficacia de los mismos a nivel de campo.

Se pudo observar que el testigo relativo (aplicación de aceite mineral) mostró mejor eficacia que varios fungicidas, sobre todo en la población silvestre (SC) y en LR, principalmente en las aplicaciones de 8 DPI. Según Pérez (2006) el aceite mineral inhibe los procesos de desarrollo del patógeno y la evolución de la enfermedad, cuando es aplicado en las primeras fases de desarrollo del patógeno. El mismo autor menciona que a la dosis de 5 L ha^{-1} (dosis utilizada en esta investigación) el aceite actúa fundamentalmente como vehículo de los fungicidas, mejorando la cobertura y penetración de los mismos y que a dosis mayores (10 L ha^{-1}) inhiben la germinación, el crecimiento de los tubos germinativos y formación de apresorios, así como la penetración y la evolución de los síntomas de rayas a manchas. Además, Guzmán y Romero (1996) citados por Pérez (2006), observaron que al aumentar la dosis de aceite de 5 a 10 y 15 L ha^{-1} se dio una disminución de la afectación del área foliar, se presentaron periodos de incubación más largos y menor severidad de los ataques, que en plantas no tratadas y otras tratadas con clorotalonil. Sin embargo, en este caso aunque se obtuvo muy buena eficacia con 5 L ha^{-1} , es extraño el hecho de que algunos fungicidas aplicados en emulsión con la misma dosis de aceite mineral utilizada en la aplicación de solo aceite, presentaran menor eficacia que la misma, lo que podría estar indicando un efecto de incompatibilidad que acelere el desarrollo de los síntomas en estos fungicidas, por lo que sería conveniente realizar un estudio en este sentido.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, refuerzan la idea de que la resistencia a fungicidas es un problema muy serio, que pone en riesgo la producción bananera y cuestionan la sostenibilidad de las estrategias de control basadas en la aplicación de fungicidas sistémicos. Además, refuerzan la necesidad de un manejo integrado de la enfermedad, con la adopción decidida del combate cultural y el desarrollo de técnicas de combate biológico que contribuyan al manejo del problema y reduzcan el impacto ambiental y el riesgo a la salud humana.

6. CONCLUSIONES

- La pérdida de sensibilidad a los fungicidas en las poblaciones de *M. fijiensis* está fuertemente influenciada por su historial de aplicaciones y la presión de selección ejercida por el uso de los mismos. Fue así que la población silvestre de Santa Clara (sin historial de aplicaciones de fungicidas) fue la más sensible, seguida por La Rita (población de una finca experimental con uso intermedio de fungicidas) y la población de la finca comercial Palacios (con amplio historial de aplicaciones) fue la menos sensible.
- Las aplicaciones de fungicidas realizadas cuando han transcurrido pocos días después de la infección (8 DPI) mostraron mejor efecto que las aplicaciones realizadas a 12 y 16 DPI. Lo anterior debido a que para este momento no se ha cumplido el PI y las infecciones son más recientes.
- El mayor efecto de los fungicidas fue obtenido en las plantas con candelas con estados de apertura 0-6.
- Los periodos de incubación de todos los tratamientos fueron menores en la población silvestre (SC), lo que hace pensar en una posible mayor agresividad en esta población. Lo anterior sin dejar de lado las diferencias en condiciones ambientales entre los sitios de estudio.

- Las poblaciones resistentes evidenciaron una posible pérdida de aptitud parasítica “fitness” al ser menos agresivas que la población silvestre, lo cual se reflejó en los PI y menor severidad.
- La pérdida de sensibilidad medida *in vitro* en las poblaciones del patógeno, repercute en un detrimento de la eficacia biológica de los fungicidas sistémicos en campo.
- La eficacia biológica de los fungicidas varió en las poblaciones evaluadas: SC>LR>PAL, relacionado con la sensibilidad observada *in vitro* SC>LR>PAL.
- Se destacaron en SC por su eficacia los fungicidas: pyraclostrobin, difenoconazole, propiconazole, epoxiconazole, fenpropimorph y en menor medida el tridemorph y boscalid, en LR: el pyraclostrobin, difenoconazole, boscalid, tridemorph y dietofencarb, mientras que en PAL todos los fungicidas fueron poco efectivos y sobresalieron ligeramente la spiroxamina y propiconazole.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar mejoras en la metodología de aplicación de los tratamientos, principalmente con respecto al volumen adecuado para las aplicaciones de campo.
- Utilizar un coadyuvante “anti deriva” con el fin de obtener una mejor cobertura, en el momento de realizar las aplicaciones en el campo y evitar pérdidas por gotas finas que queden suspendidas en el aire.
- Evaluar dosis superiores a la recomendada en la etiqueta, como una posible medida anti-resistencia, tomando en cuenta factores como fitotoxicidad, costo, riesgo ambiental y residuos tóxicos en la cosecha, ya que como se pudo observar en los análisis de sensibilidad *in vitro*, al

aumentar la concentración de fungicida en el medio, la sensibilidad de las poblaciones resistentes alcanza el mismo nivel que la población silvestre.

- Estandarizar los estados de apertura de la hoja candela, con el fin de disminuir la variabilidad de los datos, utilizando únicamente estados de apertura 4 y 6.
- En nuevos ensayos, aplicar tratamientos únicamente en 8 DPI y aumentar el número de repeticiones por tratamiento.
- Realizar estudios de agresividad y otros parámetros de aptitud parasítica en condiciones controladas, en las poblaciones evaluadas en esta investigación.
- Realizar estudios de resistencia cruzada entre los triazoles evaluados, debido a que se pudo observar este fenómeno entre el propiconazole y difenoconazole pero no con el epoxiconazole, al cual no se observó resistencia en las poblaciones evaluadas.
- Realizar estudios con nuevos ingredientes activos, principalmente que pertenezcan a otros grupos químicos y con diferentes mecanismos de acción a los utilizados en la presente investigación, que puedan contribuir al combate de esta agresiva enfermedad y al manejo de resistencia en las poblaciones del patógeno.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5 ed. Elsevier Academic Press. Florida, USA. 930p
- Aguilar-Barragan, A; García-Torres, A; Odriozola-Casas, O; Macedo-Raygoza, G; Ogura, T; Manzo-Sánchez, G; James, A; Islas-Flores, I. 2014. Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. Brazilian Journal of Microbiology. 45(1): 359-364.
- Alvarado, G. 2002. Sensibilidad de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet a fungicidas sistémicos en plantaciones de plátano en Panamá. Tesis MSc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 59 h.
- Alvarez, M. 1991. Resistencia cruzada negative entre los fungicidas benomilo y dietofencarb en aislamientos de *Botrytis cinerea* de vides. Agricultura Técnica. 51(2): 171-176.
- Amil, A; Heaney, S; Stanger, C; Shaw, M. 2007. Dynamics of QoI sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis* in Costa Rica during 2000 to 2003. Phytopathology. 97(11): 1451-1457
- Amiri, A; Brannen, P; Schnabel, G. 2010. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. Plant Disease. 94(6): 737-743
- Avenot, H; Michailides, T. 2007. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from Pistachio in California. Plant Disease. 91(10): 1345-1350
- Baloch, R; Mercer, E. 1987. Inhibition of sterol $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerase and $\Delta 14$ -reductase by fenpropimorph tridemorph and fenpropidin in cell-free enzyme systems from *Saccharomyces cerevisiae*. Phytochemistry. 26(3): 663-668.

- Bardas, G; Myresiotis, C; Karaoglanidis, G. 2008. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 98(4):443-450.
- Bardas, G; Veloukas, T; Koutita, O; Karaoglanidis, G. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, Qols and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science*. 66(9): 967-973.
- Beckerman, J. 2013. Detection of fungicide resistance (en línea). Consultado 26 nov. 2014. Disponible en <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44733.pdf>
- Beckerman, J; Sundin, G; Rosenberger, D. 2015. Do some IPM concepts contribute to the development of fungicide resistance? Lessons learned from the apple scab pathosystem in the United States. *Pest Management Science*. 71: 331-342.
- Brent, K; Hollomon, D. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?. 2 ed. Bruselas, Bélgica. FRAC. 55p
- Brown, J; Slater, S; See, K. 1991. Sensitivity of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* to morpholine and piperidine fungicides. *Crop Protection*. 10(6): 445-454.
- Calvo, C; Romero, R. 1996. Distribución y dinámica de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis*, a los fungicidas propiconazole y tridemorph en banana (en línea). Consultado 12 feb. 2015. Disponible en http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_x/a50-2388-II_077.pdf
- Cañas-Gutiérrez, G; Angarita-Velásquez, M; Restrepo-Flórez, J; Rodríguez, P; Moreno, C; Arango, R. 2009. Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*. 65(8): 892-899.
- Carr, C. 2009. Aislamiento y selección de hongos antagonistas en plantaciones de banano para el combate biológico de la Sigatoka negra. Tesis Lic. San Carlos, CR, TEC. 87 h.

- Cervantes, I. 1995. Influencia de las condiciones meteorológicas sobre el comportamiento de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), en plátano (*Musa AAB*). Tesis Lic. Turrialba, CR, UCR. 70h.
- Chapeland, F; Fritz, R; Lanen, C; Gredt, M; Leroux, P. 1999. Inheritance and Mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). Pesticide Biochemistry and Physiology. 64(2): 85-100.
- Chapman, K; Sundin, G; Beckerman, J. 2011. Identification of resistance to multiple fungicides in field populations of *Venturia inaequalis*. Plant Disease. 95(8): 921-926
- Chávez, T. 2012. Análisis genético de la resistencia a triazoles en aislados de *Mycosphaerella fijiensis* para poblaciones de Ecuador. Tesis Lic. Guayaquil, Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral. 99 h.
- Chen, F; Liu, X. 2013. Field strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MCB and DMI fungicides isolates from Stone fruit in the Eastern United States. Plant Disease. 97(8): 1063-1068.
- Chong, P; Rodríguez, H. 2007. Diversidad Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Provenientes de Haciendas Bananeras con Manejo Orgánico y Convencional. Revista Tecnológica ESPOL. 20(1): 215-222
- Churchill, A. 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: Progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Molecular Plant Pathology. 12(4): 307-328.
- Cools, H; Bayon, C; Atkins, S; Lucas, J; Fraaije, B. 2012. Overexpression of the sterol 14 α - demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. Pest Management Science. 68: 1034-1040.

- Cools, H; Fraaije, B. 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Management Science*. 69: 150-155
- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). 2013. Industria bananera en Costa Rica (en línea). Consultado 12 mar. 2015. Disponible en https://www.corbana.co.cr/categories/categoria_1344368863
- Cox, K; Bryson, P; Schnabel, G. 2006. Instability of propiconazole resistance and fitness in *Monilinia fructicola*. *Phytophology*. 97(4): 448-453
- Debieu, D; Bach, J, Arnold, A; Brousset, S; Gredt, M; Taton, M; Rahier, A; Malosse, C; Leroux, P. 2000. Inhibition of ergosterol biosynthesis by morpholine, piperidine, and spiroketalamine fungicides in *Microdochium nivale*. Effect on sterol composition and sterol $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ - isomerase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 67(2): 85-94
- Dekker, J. 1982. Introduction, pp. 1-6. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, The Netherlands, 1982.
- Derpman, J. 2013. Characterisation of fitness parameters and population dynamics of *Botrytis cinerea* for the development of fungicide resistance management strategies in grapevine. Tesis PhD. Alemania, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 132 h.
- De Waard, M. 1997. Significance of ABC transporters in fungicides sensitivity and resistance. *Pesticide Science*. 51(3): 271-275.
- Etebu, E; Young-Harry, W. 2011. Control of black Sigatoka disease: Challenges and prospects. *African Journal of Agricultural Research*. 6(3): 508-514.
- Fairchild, K; Miles, T; Wharton, P. 2013. Assessing fungicide resistance in population of *Alternaria* in Idaho potato fields. *Crop Protection*. 49: 31-39.

- Fernández-Ortuño, D; Torés, J; de Vicente, A; Pérez-García, A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology*. 11: 1-9.
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2012. Minutes and Use Recommendations of Bi-Annual Meetings (en línea). Consultado 09 abr. 2014. Disponible en http://www.frac.info/work/Banana%20FRAC_Minutes%202012_Sp.pdf
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2014a. Summary of FRAC guidelines for Banana (en línea). Consultado 08 abr. 2014. Disponible en <http://www.frac.info/work/Summary%20Banana%20FRAC%20Guidelines%20>
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2014b. FRAC code list 2014: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC code numbering) (en línea). Consultado 11 feb. 2015. Disponible en <http://www.frac.info/publication/anhang/2014%20FRAC%20Code%20List.pdf>
- Fraaije, B; Bayon, C; Atkins, S; Cools, H; Lucas, J; Fraaije, M. 2012. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septorial leaf blotch in wheat. *Molecular Plant Pathology*. 13(3): 263-275.
- Fraaije, B; Cools, H; Fountaine, J; Lovell, D; Motteram, J; West, J; Lucas, J. 2005. Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*. 95(8): 933-941
- Fuchs, A; De Waard, M. 1982. Resistance to ergosterol-biosynthesis inhibitors: I. Chemistry and phenomenological aspects. pp. 71-86. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, The Netherlands, 1982.
- Ganry, J; de Lapeyre de Bellaire, L; Lescot, T. 2012. An Integrated Approach to Control the Black Leaf Streak Disease (BLSD) of Bananas, while Reducing Fungicide Use and Environmental Impact (en línea). Consultado 02 jul. 2014. Disponible en

<http://cdn.intechopen.com/pdfs/26030/InTech->

[An integrated approach to control the black leaf streak disease blsd of bananas while reducing fungicide use and environmental impact.pdf](#)

- Gauhl, F. 1994. Epidemiology and ecology of black sigatoka: (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain and banana (*Musa* spp.) in Costa Rica, Central America. Francia. INIBAP. 120p.
- Georgopoulos, S. 1982a. Detection and measurement of fungicide resistance. pp. 25-30. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, The Netherlands, 1982.
- Georgopoulos, S. 1982b. Genetical and biochemical background of fungicide resistance. pp. 46-52. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, The Netherlands, 1982.
- Georgopoulos, S. 1982c. Cross-resistance. pp. 53-59. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, The Netherlands, 1982.
- Gómez, M. 2013. Efecto de las condiciones de incubación y de compuestos inorgánicos y orgánicos sobre la esporulación de lesiones de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Tesis Lic. San Carlos, CR, TEC. 99 h.
- Guzmán, M. 2002. Situación de la Sigatoka negra en Costa Rica y opciones para el manejo de la enfermedad. Memorias XV reunión, Cartagena de Indias ACORBAT. Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA (en línea). Consultado 24 ago. 2013. Disponible en http://www.Musalit.org/pdf/IN030027_es.pdf
- Guzmán, M. 2003a. Epidemiología de la Sigatoka negra y el sistema de preaviso biológico, pp. 25-26. En: Rivas, G; Rosales, F (eds). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Actas del taller “Manejo convencional y alternativo de la

Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas”. Guayaquil, Ecuador, 11-13 de agosto, 2003. INIBAP.

Guzmán, M. 2003b. Resistencia a fungicidas en *Mycosphaerella fijiensis*: situación actual y perspectivas para el manejo de la Sigatoka negra, pp. 33-34. En: Rivas, G; Rosales, F (eds). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Actas del taller “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas”. Guayaquil, Ecuador, 11-13 de agosto, 2003. INIBAP.

Guzmán, M. 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina, pp. 83- 91. En: Memorias XVII Reunión Internacional ACORBAT, 2006. Acorbat- Acafruta, Joinville, Brasil.

Guzmán, M. 2007. Estrategias para el manejo de la resistencia de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra en banano, a fungicidas triazoles. Tesis M.Sc. San José, CR, UCR. 116 h.

Guzmán, M. 2012. Control biológico y cultural de la Sigatoka negra. 45 Congreso Brasileiro de Fitopatología. Manaus, AM, agosto, 2012. Brazilian Phytopathological Society.

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

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

- Jacome, L; Schuh, W; Stevenson, R. 1991. Effect of temperatura and relative humidity on germination and germ tuve development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopathology*. 81(12): 1480-1485.
- Kaars, S. 1982. Mechanism of action of fungicides, pp. 33-45. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, The Netherlands, 1982.
- Karaoglanidis, G; Ioannidis, P; Thanassoulopoulos, C. 2001. Influence of fungicide spray schedules on the sensivity of *Cercospora beticola* to the sterol demethylation-inhibiting fungicide flutriafol. *Crop Protection*. 20(10): 941-947.
- Karaoglanidis, G; Karadimos, D; Ioannidis, P. 2003. Detection of resistance to sterol demethylation-inhibiting (DMI) fungicides in *Cercospora beticola* and efficacy of control of resistant and sensitive strains with flutriafol. *Phytoparasitica*. 31(4): 373-380.
- Kendall, S; Hollomon, D; Cooke, L; Jones, D. 1993. Changes in sensivity to DMI fungicides in *Rhynchosporium secalis*. *Crop Protection*. 12(5): 357-362
- Kerkenaar, A. 1983. Mode of action of tridemorph and related compounds. *Mode of Action, Metabolism and Toxicology*. 3: 123-127.
- Kerkenaar, A; Uchiyama, M; Versluis, G. 1981. Specific effects of tridemorph on sterol biosynthesis in *Ustilago maydis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 16(2): 97-104.
- Khilare, V; Gangawane, L. 2001. Role of oxidative enzymes in thiophanate-methyl resistance in *Penicillium digitatum*, the green mold of sweet orange. *Indian Phytopathology*. 55(1): 73-74.
- Kim, Y; Dixon, E; Vincelli, P; Farman, M. 2003. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology*. 93(7): 891-900.

- Kim, Y; Xiao, C. 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cinerea* from stored apples in Washington State. *Plant Disease*. 94(5): 604-612
- Kim, Y Xiao, C. 2011. Stability and fitness of pyraclostrobin- and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from Apple. *Phytopathology*. 101(11): 1385-1391
- Köller, W; Wilcox, W; Barnard, J; Jones, A; Braun, P. 1997. Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology*. 87(2): 184-190.
- Konstantinou, S; Veloukas, T; Leroch, M; Menexes, G; Hahn, M; Karaoglanidis, G. 2015. Population structure, fungicide resistance profile, and *sdhB* mutation frequency of *Botrytis cinerea* from strawberry and greenhouse-grown tomato in Greece. *Plant Disease*. 99(2): 240-248.
- Kretschmer, M; Leroch, M; Mosbach, A; Walker, A; Fillinger, S; Mernke, D; Schoonbeek, H; Pradier, J; Leroux, P; De Waard, M; Hahn, M. 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the gray mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*. 5(12): s.p.
- Lasseron-De Falandre, A; Debieu, D; Bach, J; Malosse, C; Leroux, P. 1999. Mechanisms of resistance to fenpropimorph and terbinafine, two sterol biosynthesis inhibitors, in *Nectria haematococca*, a phytopathogenic fungus, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 64(3): 167-184.
- Latorre, B; Spadaro, I; Rioja, M. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*. 21(10): 957-961.
- Latorre, B; Torres, R. 2012. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection*. 40: 49-52.

- Leroux, P; Walker, A. 2010. Multiple mechanism account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. Pest Management Science. 16p.
- López-Ruiz, F; Pérez-García, A; Fernández-Ortuño, D; Romero, D; García, E; de Vicente, A; Brown, J; Tóres, J. 2010. Sensitivities to DMI fungicides in populations of *Podosphaera fusca* in south central Spain. Pest Management Science. 66(7): 801-808.
- Lucas, J; Hawkins, N; Fraaije, B. 2015. The evolution of fungicide resistance. Advances in Applied Microbiology. 90: 29-92
- Manzo, G; Guzmán, S; Rodríguez, C; James, A; Orozco-Santos, M. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. Revista Mexicana de Fitopatología. 23(1): 87-96
- Marín, D; Romero, R; Guzmán, M; Sutton, T. 2003. Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. Plant Disease. 87(3): 208-222
- Martínez, L; Villalta, R; Soto, E; Murillo, G; Guzmán, M. 2011. Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano (en línea). Consultado 24 ago 2013. Disponible en <http://www.infoagro.net/programas/Ambiente/pages/adaptacion/casos/Sigatoka.pdf>
- Martínez, L; Téliz, D; Rodríguez, C; Mora, A; Nieto, D; Cortés, I; Mejía, D; Nava, C; Silva, G. 2012. Resistencia de fungicidas en poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* del sureste mexicano. Agrociencia. 46(7): 707-717.
- McCartney, C; Mercer, P; Cooke, L; Fraaije, B. 2007. Effects of a strobilurin-based spray programme on disease control, green leaf area, yield and development of fungicide-resistance in *Mycosphaerella graminicola* in Northern Ireland. Crop Protection. 26(8): 1272-1280.
- Miyamoto, T; Ishii, H; Seko, T; Kobori, S; Tomita, Y. 2009. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. Plant Pathology. 58(6): 1144-1151.

- Mourichon, X. 2002. Overview of progress and results since the first international workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas in 1989, pp. 11-18. En Jacome, L; Lepoivre, P; Marin, D; Ortiz, R; Romero, R; Escalante, J (eds). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San José, Costa Rica, 20-23 de may 2002. INIBAP.
- Muñoz, C; Vargas, E. 2003. Manejo químico de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano curraré (*Musa* AAB) en la zona de San Carlos y elaboración de un sistema de información computacional para el manejo técnico de plantaciones de musáceas. Informe final proyecto de investigación. I.T.C.R. 58h
- Myresiotis, C; Karaoglanidis, G; Tzavella-Klonari, K. 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hidroxyanilide, benzimidazole, and dicarboxamide fungicides. *Plant Disease*. 91(4): 407-413.
- Narayanasamy, P. 2011. Assessment of variability in fungal plant pathogens. *Microbial and Plant Pathogens – Detection and Disease Diagnosis: Fungal Pathogens*. 291p.
- Ortiz, R; Morales, A; Ponchner, S; Segura, A. 2010. El cultivo del banano. Editorial EUNED. San José, Costa Rica. 186p.
- Palani, P; Lalithakumari, D. 1999. Resistance of *Venturia inaequalis* to the sterol biosynthesis-inhibiting fungicide, penconazole[1-(2-(2,4-dichlorophenyl) pentyl)-1H-1,2,4-triazole]. *Mycological Research*. 103(9): 1157-1164.
- Pappas, A. 1997. Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protection*. 16(3): 257-263
- Parker, J; Warrilow, A; Price, C; Mullins, J; Kelly, D; Kelly, S. 2014. Resistance to antifungals that target CYP51. *Journal of Chemical Biology*. 7(4): 143-161.

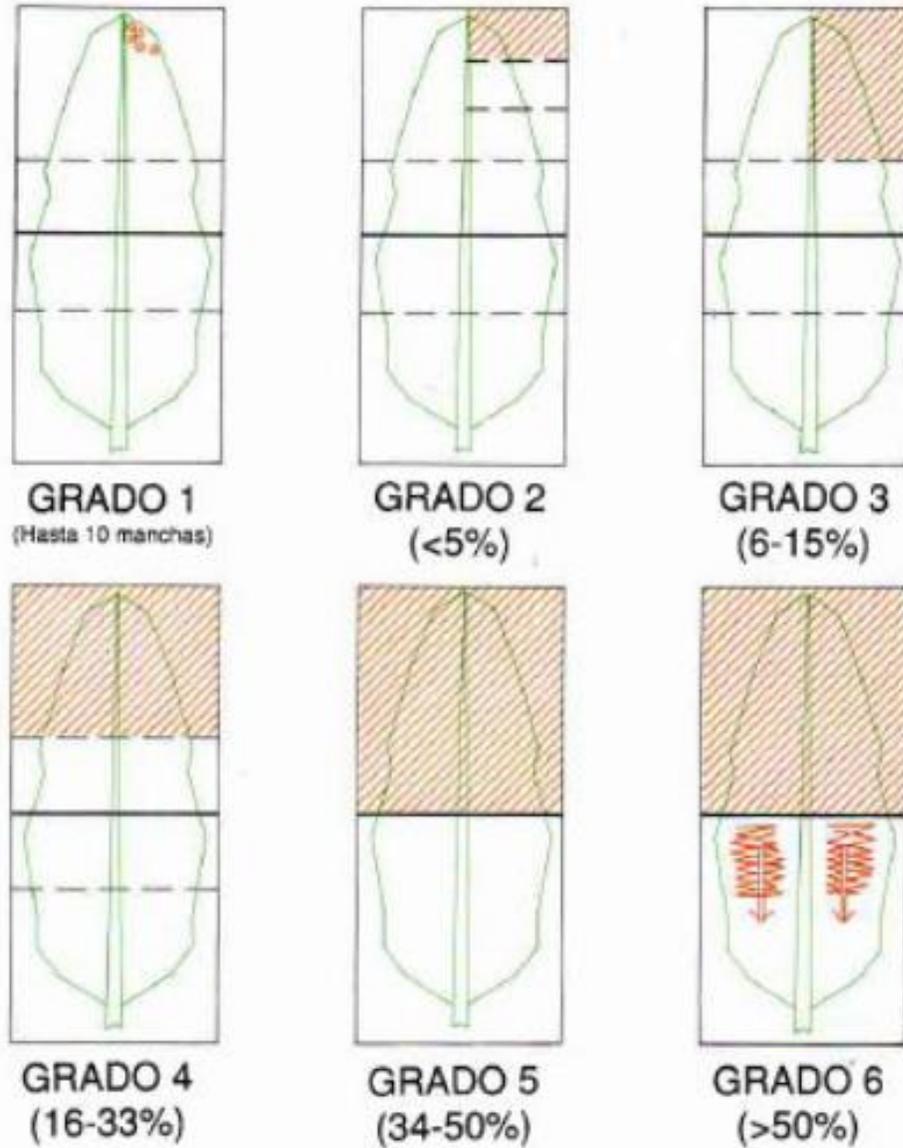
- Parvatha, P. 2013. Recent advances in crop protection. Springer. India. 268p.
- Pasche, J; Wharam, C; Gudmestad, N. 2004. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. Plant Disease. 88(2): 181-187.
- Pérez, L. 2006. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra en bananos: estado actual y perspectivas. Fitosanidad. 10(1): 55-72.
- Pérez, L. 2012. A holistic integrated management approach to control black sigatoka disease of banana caused by *Mycosphaerella fijiensis*. Manual técnico. FAO. 30 p.
- Pérez, L; Batlle, A; Hernández, A; Pérez, M; Trujillo, R; Álvarez, C; Méndez, A. 2003. Evolución de la sensibilidad a fungicidas de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en banano en Cuba. Fitosanidad. 7(3): 49-54.
- Pérez, M; Rebullido, R; Pérez, L. 2004. Líneas base de sensibilidad de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de Cuba, a los fungicidas azoxystrobin y trifloxystrobin. Fitosanidad. 8(3): 41-47.
- Rallos, L; Johnson, N; Schmale, D; Prussin, A; Baudoin, A. 2014. Fitness of *Erysiphe necator* with G143A-based resistance to quinona outside inhibitors. Plant Disease. 98(11): 1494-1502.
- Robinson, J; Galán, V. 2011. Plátanos y Bananos. 2 ed. Mundi – Prensa, España. 321p.
- Rivas-Platero, G; Zapater, M; Abadie, C; Carlier, J. 2003. Genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra de las musáceas en los trópicos, pp. 19-23. En: Rivas, G; Rosales, F (eds). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Actas del taller “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas”. Guayaquil, Ecuador, 11-13 de agosto, 2003. INIBAP.

- Rodríguez, P; Cayón, G. 2008. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana*. 26(2): 256-265
- Romero, R. 1997. Avances en epidemiología y manejo de la Sigatoka negra del banano. *Agronomía Costarricense*. 21(1): 77-81
- Romero, R; Sutton, T. 1997. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology*. 87: 96-100.
- Romero, R; Sutton, T. 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black Sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Disease*. 82: 931-934.
- Sánchez-Torres, P; Tuset, J. 2011. Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biology and Technology*. 59: 159-165
- Scot, N. 2008. Black Leaf Streak of Banana (en línea). *Plant Disease*. Consultado 26 feb 2014. Disponible en <http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-50.pdf>
- Schwinn, F. 1982a. Chemical control of fungal diseases: importance and problems, pp. 7-15. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, The Netherlands, 1982.
- Schwinn, F. 1982b. Socio-economic impact of fungicide resistance, pp. 16-23. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, The Netherlands, 1982.
- Sierotzki, H; Wullschleger, J; Gisi, U. 2000. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to Strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 68(2): 107-112
- Soto, M. 1985. *Banano: cultivo y comercialización*. 2 ed. LIL S.A. San José, Costa Rica.

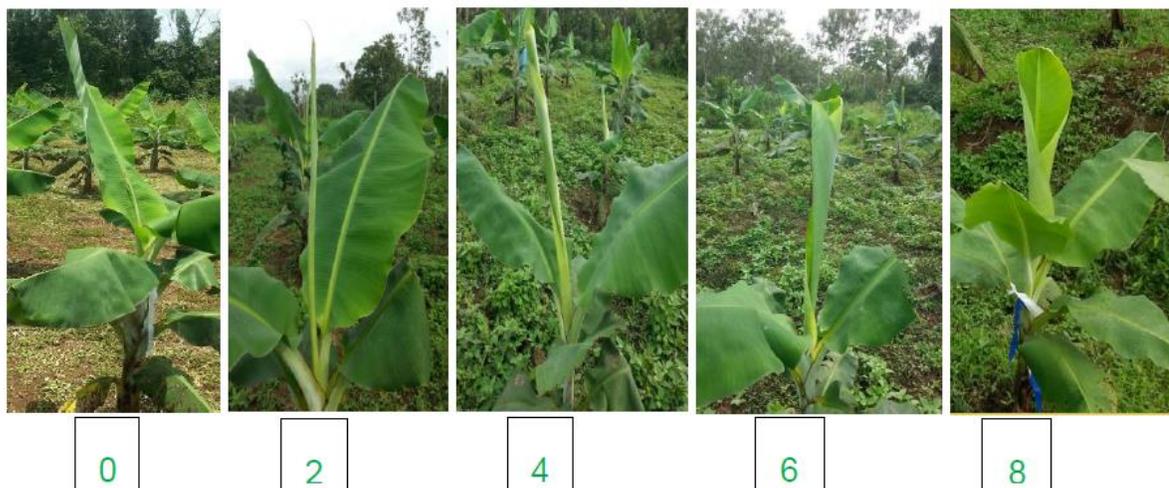
- Stammler, G; Taher, K; Koch, A; Haber, J; Liebmann, B; Bouagila, A; Yahyaoui, A; Nasraoui, B. 2011. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates from Tunisia to epoxiconazole and pyraclostrobin. *Crop Protection*. 34: 32-36.
- Stover, R. 1980. Sigatoka Leaf Spots of Bananas and plantains. *Plant Disease*. 64(8): 750-757.
- Suga, H; Nakajima, T; Kageyama, K; Hyakumachi, M. 2011. The genetic profile and molecular diagnosis of thiophanate-methyl resistant strains of *Fusarium asiaticum* in Japan. *Fungal Biology*. 115(12): 1244-1250.
- Sun, H-Y; Wang, H-C; Chen, Y; Li, H-X; Chen, C-J; Zhou, M-G. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. *Plant Disease*. 94(5): 551-556.
- Taksonyi, P; Kocsis, L; Mátyás, K; Taller, J. 2013. The effect of quinone outside inhibitor fungicides on powdery mildew in a grape vineyard in Hungary. *Scientia Horticulturae*. 161: 233-238
- Veloukas, T; Leroch, M; Hahn, M; Karaoglanidis, G. 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease*. 95(10): 1302-1307.
- Yan, X; Ma, W; Li, Y; Wang, H; Que, Y; Ma, Z; Talbot, N; Wang, Z. 2011. A sterol 14 α -demethylase is required for conidiation, virulence and for mediating sensitive to sterol demethylation inhibitors by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*. 48(2): 144-153.
- Ziogas, B; Oesterhelt, G; Masner, P; Steel, C; Furter, R. 1991. Fenpropimorph: A three site inhibitor of ergosterol biosynthesis in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 39(1): 74-83.

9. ANEXOS

Anexo 1. Escala de Stover modificada por Gauhl (1989).



Anexo 2. Estados de apertura de la hoja candela según la Escala de Brun (1963). Murillo 2015. Santa Clara, San Carlos.



Anexo 3. Resumen de los datos climáticos, obtenidos de las estaciones meteorológicas más cercanas a cada una de las parcelas experimentales. Estación Santa Clara, TEC para la parcela experimental de Santa Clara, Estación La Rita, CORBANA para la parcela experimental de La Rita y Estación Valquiria para la parcela experimental de Palacios. 2014.

Mes	Estación Santa Clara, TEC				
	Temp. Prom (°C)	Max	Min	Precipitación (mm)	Humedad prom. (%)
Enero	26,4	31,3	21,5	150,3	87,5
Febrero	25,8	31,8	19,8	20,2	83,8
Marzo	26,3	32,6	20,1	16,3	77,8
Abril	27,4	32,4	22,5	92,8	82,0
Mayo	27,5	32,8	22,3	187,9	84,2
Junio	26,9	30,8	23,1	454,2	93,8
Julio	26,3	29,5	23,2	596,9	95,1
Agosto	27,0	31,4	22,6	204,3	90,5
Septiembre	26,8	31,4	22,3	387,7	93,2
Octubre	26,9	31,3	22,4	364,0	92,4
Noviembre	25,7	29,3	22,1	365,4	94,1
Diciembre	24,6	27,8	21,4	420,7	93,7

Mes	Estación La Rita, Pococí				
	Temp. Prom (°C)	Max	Min	Precipitación (mm)	Humedad prom. (%)
Enero	24,2	32,1	17,4	245,3	90,8
Febrero	24,7	32,3	17,2	69,6	87,1
Marzo	25,3	33,0	18,6	53,4	84,9
Abril	25,7	32,9	18,7	268,3	90,4
Mayo	26,1	33,3	20,6	292,8	90,5
Junio	26,0	32,9	22,0	765,7	94,1
Julio	25,3	32,2	20,8	1157,8	96,2
Agosto	25,8	34,0	21,2	364,2	92,2
Septiembre	25,8	34,2	20,3	224,5	91,5
Octubre	25,8	34,9	21,1	274,0	92,4
Noviembre	25,1	32,9	19,1	475,5	92,9
Diciembre	24,1	32,4	19,3	751,3	94,5

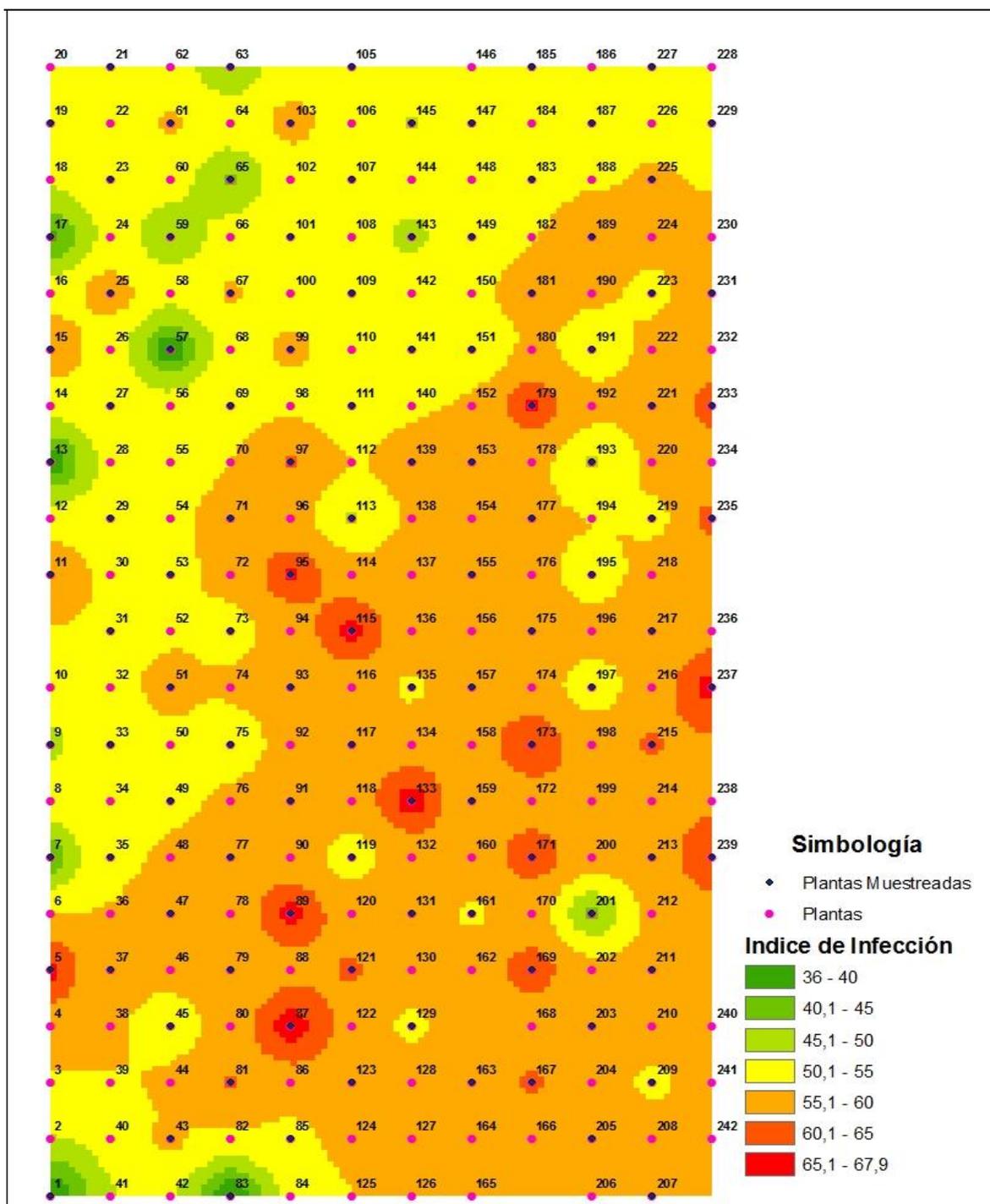
Mes	Estación Valquiria, Palacios				
	Temp. Prom (°C)	Max	Min	Precipitación (mm)	Humedad prom. (%)
Enero	23,8	33,1	16,6	303,0	86,1
Febrero	24,5	33,2	15,7	53,5	81,7
Marzo	25,0	33,8	17,7	76,9	80,6
Abril	25,4	34,1	17,8	339,5	84,9
Mayo	26,1	34,5	19,4	335,7	83,9
Junio	25,5	34,0	21,4	649,0	88,2
Julio	24,7	33,5	20,3	1375,2	90,8
Agosto	25,5	35,1	20,6	502,5	86,1
Septiembre	25,7	35,4	19,7	220,0	85,2
Octubre	25,5	35,6	19,7	267,4	85,8
Noviembre	24,6	33,9	18,7	634,7	88,1
Diciembre	23,4	33,0	18,9	859,5	89,9

Anexo 4. Dosis de fungicida, aceite, agua y emulsificante utilizados en la preparación de 150 ml de emulsión de cada tratamiento, para las aplicaciones en campo.

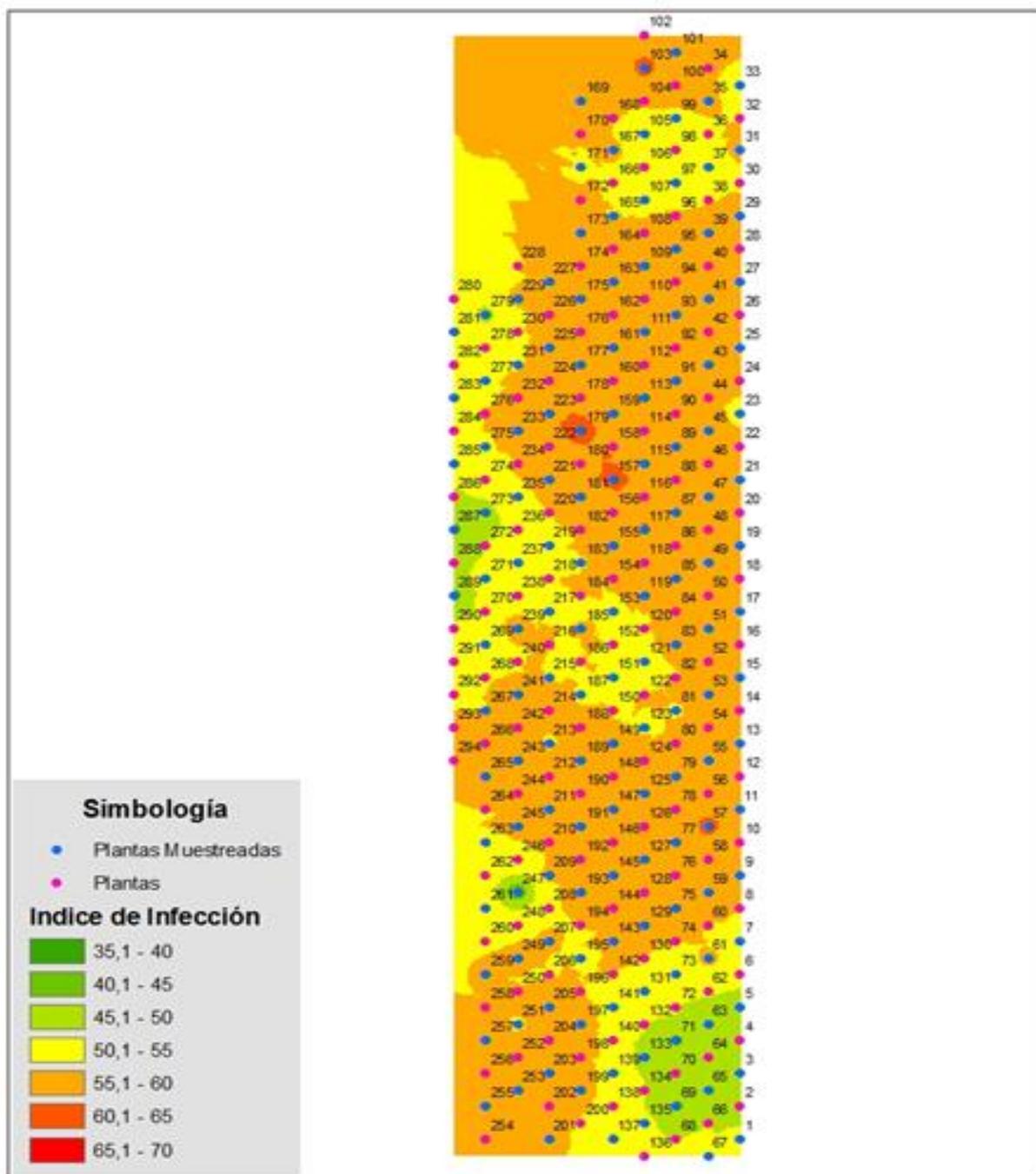
Fungicida	Ingrediente activo	Dosis de fungicida	Aceite (ml)	Emulsificante (ml)	Agua (ml)	Dosis p.c./ha
Tilt 25 EC	propiconazole	0,17 ml	2,14	0,02	147,67	400 ml
Sico 25 EC	difenoconazole	0,17 ml	2,14	0,02	147,67	400 ml
Opus 12,5 EC	epoxiconazole	0,34 ml	2,14	0,02	147,50	800 ml
Calixin 86 OL	tridemorph	0,21 ml	2,14	0,02	147,63	500 ml
Impulse 80 EC	spiroxamina	0,21 ml	2,14	0,02	147,63	400 ml
Volley 88 EC	fenpropimorph	0,30 ml	2,14	0,02	147,54	700 ml
Regnum 25 EC	pyraclostrobin	0,17 ml	2,14	0,02	147,67	400 ml
Cumora 50 SC	boscalid	0,13 ml	2,14	0,02	147,71	800 ml
Cycosin 70 WP	metil tiofanato	0,12 g	2,14	0,02	147,72	280 g
Siganex 60 SC	pirymetanil	0,21 ml	2,14	0,02	147,63	500 ml
Powmyl 25 WP	dietofencarb	0,34 g	2,14	0,02	147,50	800 g
Aceite mineral	---	---	2,14	0,02	147,84	---

Anexo 5. Mapas del índice de infección de cada una de las parcelas experimentales.

- Santa Clara



- La Rita



- Palacios

