



CAPACITACION E INVESTIGACIÓN PARA EL MANEJO
INTEGRADO DE LA SIGATOKA NEGRA DEL PLATANO EN
AMERICA LATINA Y EL CARIBE

Auspiciado por: Fondo Regional de Tecnología
Agropecuaria (FONTAGRO)

DOCUMENTO II
INFORME FINAL
INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Compilado por:
Dr. Luis Pocasangre, INIBAP-LAC
Dr. Franklin E. Rosales, Coordinador Regional INIBAP-LAC
Ing. Mauricio Guzmán M.Sc., Coordinador de Fitopatología, CORBANA S.A.

Octubre, 2003

CAPACITACION E INVESTIGACIÓN PARA EL MANEJO INTEGRADO
DE LA SIGATOKA NEGRA DEL PLATANO EN AMERICA LATINA Y EL
CARIBE

Auspiciado por: Fondo Regional de Tecnología
Agropecuaria (FONTAGRO)

DOCUMENTO II
INFORME FINAL
INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Compilado por:
Dr. Luis Pocasangre, INIBAP-LAC
Dr. Franklin E. Rosales, Coordinador Regional INIBAP-LAC
Ing. Mauricio Guzmán M.Sc., Coordinador de Fitopatología, CORBANA S.A.

Octubre, 2003



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

**DETERMINACIÓN DE LA LÍNEA BASE DE SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS
EN POBLACIONES DE *MYCOSPHAERELLA FIJENSIS* EN
PLANTACIONES DE PLÁTANO, EN LA AMAZONIA BRASILEÑA**

INFORME TÉCNICO FINAL

PROYECTO FONTAGRO

**DR. LUADIR GASPAROTTO
COORDINADOR**

MANAUS, MARZO/2003

DETERMINACIÓN DE LA LÍNEA BASE DE SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS EN POBLACIONES DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* EN PLANTACIONES DE PLÁTANO, EN LA AMAZONIA BRASILEÑA

Luadir Gasparotto-Embrapa Amazônia Ocidental
Rogério Eiji Hanada-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Maurício Guzmán Quesada- CORBANA

INTRODUCCIÓN

La Sigatoka-negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es la enfermedad más grave del banano (*Musa ssp.*), cuyas pérdidas pueden atestiguar el 100% de la producción.

El control químico es la medida más prontamente disponible actualmente, pero involucra costos adicionales para la producción y daños al medio ambiente. Investigaciones desarrolladas en el Amazonas indican que bajo estas condiciones, el control químico de la enfermedad exige aplicaciones de fungicidas a cada 14 días y de protectores a cada siete días (Gasparotto et al., 2000).

En regiones tropicales húmedas, como la Amazonia Brasileña, donde las condiciones son favorables al ataque del *M. fijiensis* durante todo el año, existe la necesidad de gran número de pulverizaciones. Este hecho favorece la presión de selección de estirpes del patógeno resistentes, quebrando la efectividad de los fungicidas, conforme comprobado por Castro et al. (1995), Guzmán & Romero (1997) y Romero & Sutton (1997). Una de las formas de reducir la presión de selección es disminuir el número de aplicaciones durante el ciclo de la cultura.

El uso continuo de fungicidas sistémicos puede llevar a la selección de estirpes de *M. fijiensis* resistentes. Vargas (1996), Orozco-Santos (1998) e Vicente (1998) recomiendan que para el control de la sigatoka-negra con fungicidas sistémicos del grupo de los triazoles, benzimidazoles, morfolinas e estrobilurinas, no se debe realizar más de dos aplicaciones continuas de fungicidas del mismo grupo, con un máximo de ocho aplicaciones por año, alternando las aplicaciones, de preferencia con el uso fungicidas protectores.

Es importante resaltar que en la Amazonia Brasileña no se realiza el control químico de la Sigatoka-negra, principalmente en los plátanos. Apesar de esto y del hecho de que el hongo *M. fijiensis* haya sido introducido recientemente en la región, es importante determinar si existe alguna estirpe del patógeno en plátanos que sea resistente al propiconazole, azoxistrobina y benomil.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el mapa están relacionados en rojo los locales donde fueran recolectadas muestras para los análisis. Fueron recolectadas muestras en Rio Preto da Eva/Amazonas, Nobre/Mato Grosso, Tabatinga/Amazonas, Carubebe/Roraima, Ariquemes/Rondônia y Rio Branco/Acre. Las muestras fueron recolectadas en sitios donde nunca antes habían sido realizadas aplicaciones de fungicidas. En el Cuadro 1 se encuentran detallados los locales de recolecta de las muestras. Están siendo hechas análisis apenas de locales donde nunca se aplicaron fungicidas, ya que en Brasil no se realiza el control químico de las enfermedades del plátano.

A) Sensibilidad de las ascosporas

El material se procesó para obtener descargas de ascosporas sobre medios Agar-agua con 0,0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 y 1 mg/ L del fungicida propiconazole (Tilt 25 CE) y 0,0; 0,1; 1,0; 5,0 y 10 mg/L de los fungicidas benomil (Benlate 50 PS) y azoxistrobina (Priori Lote 003016000).

Para obtener las descargas de ascosporas, se extrajeron con sacabocados de 1,8 cm de diámetro, discos de tejido enfermo con capacidad esporulante y se pegaron con grapas metálicas sobre cuadros de papel Bond de 11 x 11 cm (5 discos por cuadro) con la superficie adaxial expuesta y se incubaron por un período de 24 horas en cámara húmeda.

Posteriormente, se sacaron de la cámara húmeda y se sumergieron en agua destilada o desionizada por cinco minutos, para promover la hidratación de los pseudotécios. Una vez cumplido el período de hidratación, se eliminó el exceso de agua de las lesiones con una toalla absorbente y se colocó a descargar en placas de Petri (una placa para cada cuadro de papel bond con 5 discos) sobre los medios con las concentraciones de fungicidas indicadas anteriormente. La descarga de las ascosporas fue realizada en tres diferentes placas de Petri por cada concentración de cada fungicida.

Las ascosporas descargadas sobre los medios, se incubaron 48 horas a 26 °C en la oscuridad. Finalmente, a través de un microscopio de luz a 40x se midió la longitud del tubo germinativo de 150 ascosporas en cada concentración de los fungicidas propiconazole y azoxistribina (50 por placa de Petri).

Para el caso del benomil, las esporas fueron separadas en cuatro categorías: 1. Esporas no germinadas, sin tubo germinativo (NG); 2. Esporas con tubos germinativos cortos, inferiores a 50 micras (TC); 3. Esporas con tubos germinativos distorciónados (TD) y 4. Esporas con germinación normal, tubos germinativos superiores a 50 micras (GN).

B) Aislamientos monoascospóricos

Del mismo material vegetal, de medios que no contengan fungicida, se obtuvo aleatoriamente 20 aislamientos monoascospóricos por sitio de muestreo. Para esto, ascosporas individuales fueron transferidas a placas de Petri conteniendo el medio papa dextrosa agar (PSA Bacto, Difco Laboratories). Después de 7 días de incubación a 26 °C y en la oscuridad, se formaron pequeñas colonias del hongo y de éstas se transferieron 20 a placas individuales conteniendo el medio Mycophil agar (BBL, Mycophil Agar).

Una vez en Mycophil, las colonias se incubaron por 15-20 días en la oscuridad a 26 °C para estimular su crecimiento micelial. Transcurrido este tiempo, en una cámara de flujo laminar, cada colonia fue colocada en un tubo de ensayo con 3 ml de agua desionizada estéril más 0,05% de Tween 20 y se sometieron a un agitador de vórtice para desprender partes del micelio.

En placas de Petri conteniendo un medio de jugo de vegetales (V8) se colocaron 10 gotas de la suspensión de partes de micelio, con el uso de una pipeta Pasteur (VWR Scientific Products) y se distribuyeron sobre la superficie del medio con una asa de vidrio. Las placas se incubaron por 7 días a 24 °C, con luz continua para estimular la esporulación conidial.

A los siete días, de las placas con V8, se tomaron de 10-15 colonias y se trasladaron a tubos de ensayo con 3 ml de agua deionizada estéril más Tween 0,05% y se agitaron con el agitador de vórtice para suspender los conidios en el agua. De esta suspensión se tomaron dos gotas con una pipeta Pasteur y se transfirieron a placas de Petri con PDA y diferentes

concentraciones de los fungicidas Propiconazole: 0,0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 y 1 mg/ L y benomil y azoxistrobina: 0,0; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 5,0 y 10 mg/L

Las placas se incubaron en la oscuridad por 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el diámetro de 10 colonias en cada concentración en un microscopio de luz a 10x.

C) Análisis de los datos

C-1) Sensibilidad de las ascosporas

La sensibilidad de las ascosporas a los fungicidas propiconazole y azoxistrobina, fue determinada por la relación entre el crecimiento del tubo germinativo (TG) de las ascosporas que se descargaron en los medios sin fungicida, respecto a las que se descargaron en los medios con fungicida.

El promedio de la longitud del TG de las ascosporas descargadas en los medios sin fungicida, se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición en el desarrollo del tubo germinativo (TG) de cada una de las ascosporas en los medios con fungicida. Con esta información se calculó el porcentaje promedio de inhibición en el desarrollo del TG en cada concentración de cada uno de los fungicidas analizados.

Con estos valores se calculó el valor de CE_{50} por medio de regresión lineal del logaritmo natural de la concentración de fungicida versus el porcentaje de inhibición del TG.

En el caso del fungicida azoxistrobina, en algunas concentraciones, las esporas pueden mostrarse sin germinar, en este caso se considerará como un 100% de inhibición en el TG. Con este mismo fungicida se hará una separación adicional del porcentaje de ascosporas en cada una de las siguientes categorías: 1. Ascosporas sin germinar; 2. Con TG < 50 micra; 3. Con TG >50 y hasta 100 micra; 4. Con TG >100 y hasta 150 micra y 5. Con TG >150 micra.

Para el benomil se establecerá el porcentaje de ascosporas en cada una de las categorías.

C-2) Aislamientos monoascospóricos

Con el diámetro de las colonias en el medio sin fungicida se calculó el porcentaje de inhibición en el crecimiento de las colonias en cada concentración. Con estos valores se calculó el valor de CE_{50} por medio de regresión lineal del logaritmo natural de la concentración de fungicida versus el porcentaje de inhibición en el crecimiento de las colonias.

RESULTADOS

Los resultados de los análisis de la sensibilidad de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas propiconazole y azoxistrobina se encuentran en el Figs. 1, 2, 3 y 4. Los valores de CE_{50} para propiconazole y azoxistrobin son bastante bajos, lo que indica una alta sensibilidad en las poblaciones. No obstante, una pequeña frecuencia de ascosporas tienen inhibiciones menores a un 50 % a un 30 % en propiconazole lo hace pensar en que una pequeña fracción de la población lleva consigo un poco de resistencia. Algo similar se observa con benomil, una muy baja frecuencia de ascosporas germinaron normalmente a 5 mg/l en Rio Preto da Eva/AM-2 Y Rio Branco/AC-3 y a 10 mg/l en Caroebe/RR-4.

El EC_{50} de las poblaciones del Rio Preto da Eva/AM-2, Tabatinga/TB-7, Ariquemes/RO-6, Caroebe/RR-4 y Rio Branco/AC-3 al fungicida propiconazole fue bastante bajo y inferior a 0,01 mg/l, pero la población de Nobre presentou menor sensibilidad(0,00667 m/l).

Com respecto al fungicida azoxistrobina, la población de Tabatinga/TB-7 fue extremadamente sensible ($EC_{50}=0,00065$ mg/l). El EC_{50} de la población de Rio Preto da Eva/AM-2 fue el bajo ($0,00065$ mg/l), el de la población de Ariquemes/RO-6 fue $0,00671$ mg/l, el de la población de Nobre/MT-5 fue intermedio ($0,03095$ mg/l), 47x más insensible que el de Tabatinga/TB-7. El EC_{50} de la población de Rio Branco/AC-3 fue alto ($0,06708$ mg/l), y de Caroebe/RR-4 fue extremadamente más alto ($0,16914$ mg/l), 69x y 176x más insensible que el de Rio Preto da Eva/AM-2 y cerca de 103x y 260x superior al de Tabatinga/TB-7.

Los resultados de los análisis de la sensibilidad de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* al fungicida benomil encuentranse en el Figs 5 y 6. En la concentración de 5 mg/l solamente las poblaciones de Rio Preto da Eva/AM-2 y Rio Branca/AC-3 presentaron ascosporas con germinación normal; y en a 10 mg/l solamente a población de Caroebe/RR-4 presentou un ascosporo con germinación normal.

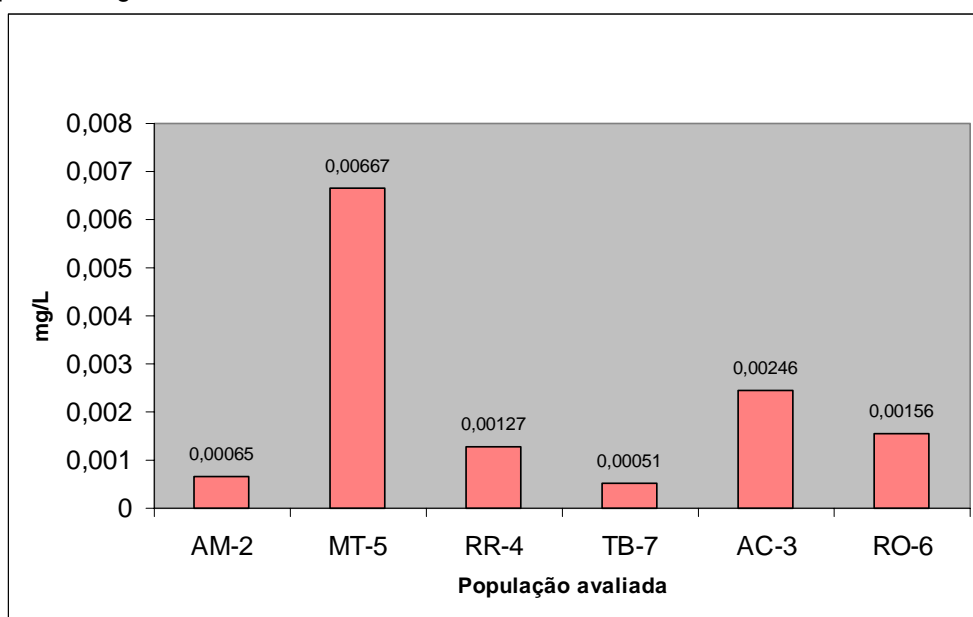


Fig. 1 – Valores de EC_{50} de propiconazole para ascosporas de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis*.

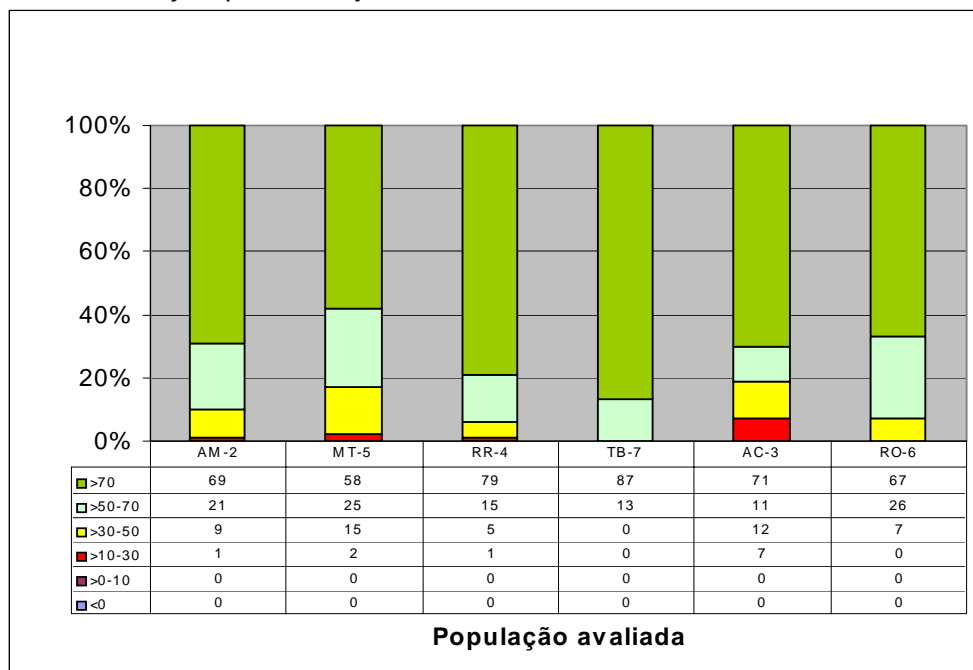


Fig. 2 – Porcentaje de ascosporas de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis*, cuyo crecimiento do tubo germinativo sufrió diferentes proporciones de inhibición, cuando sometidos al propiconazole 0,1 mg/l.

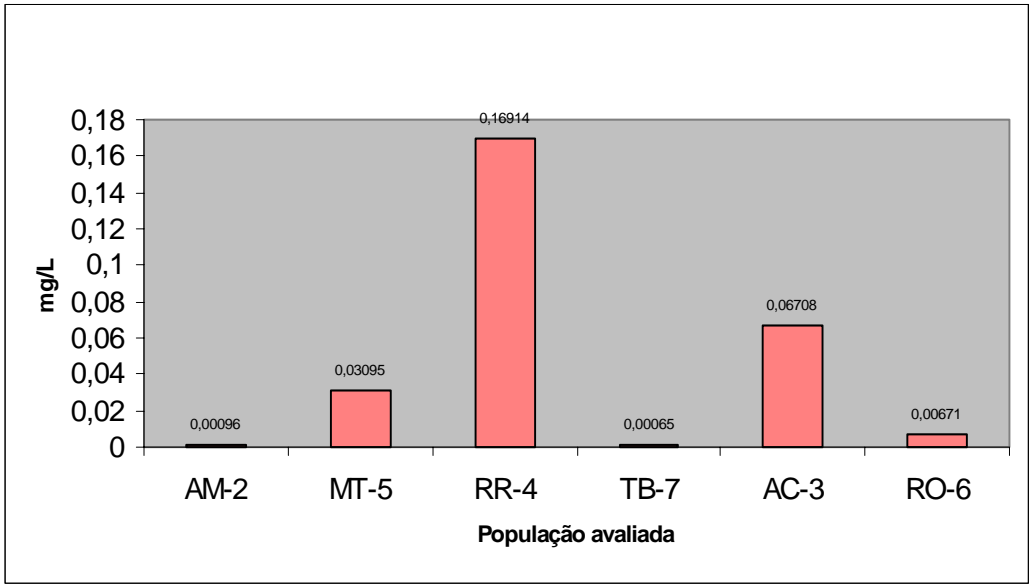


Fig. 3 – Valores de EC₅₀ de azoxistrobina para ascosporos de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis*

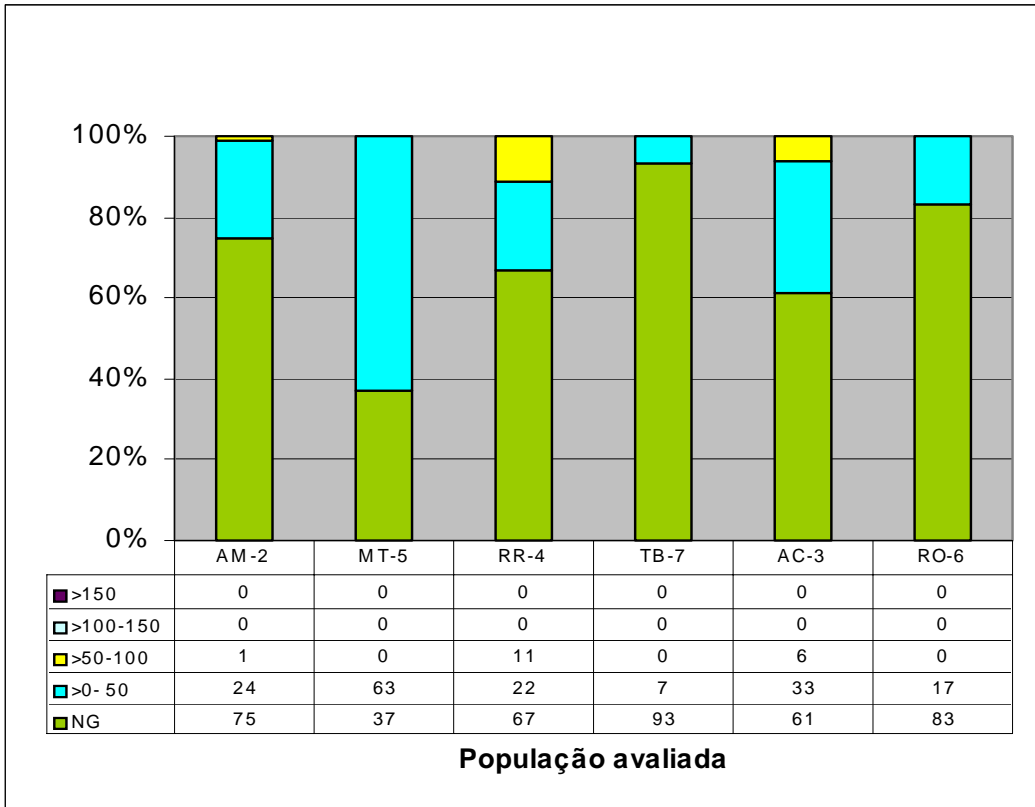


Fig. 4 – Porcentaje de ascosporos de populações de *Mycosphaerella fijiensis*, cuyos tubos germinativos presentarán diversas categorías en el largo, cuando sometidos al de azoxistrobina 5 mg/l.

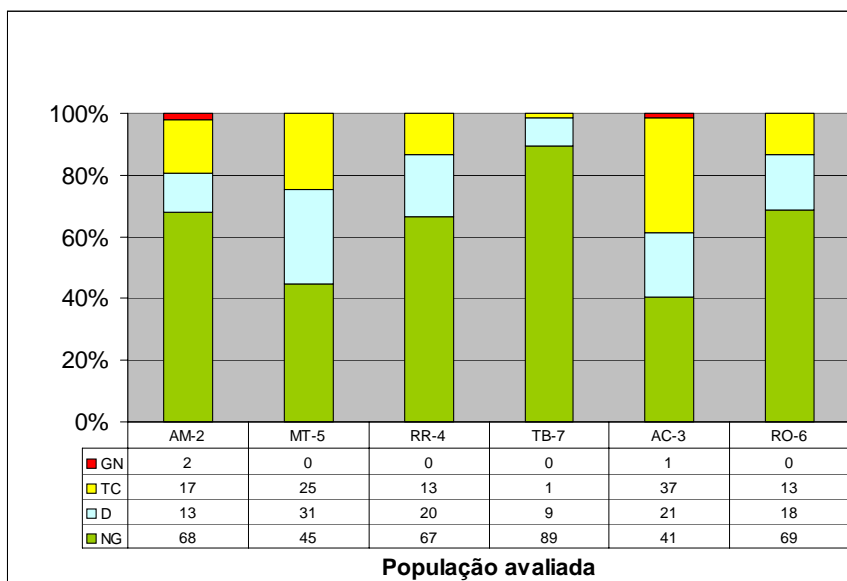


Fig. 5 – Porcentaje de ascosporos de populações de *Mycosphaerella fijiensis* que presentarón germinación normal (GN), tubo germinativo corto (TC), tubo germinativo distorcionado (D) y no germinados (NG), cuando sometidos al benomil 5 mg/l.

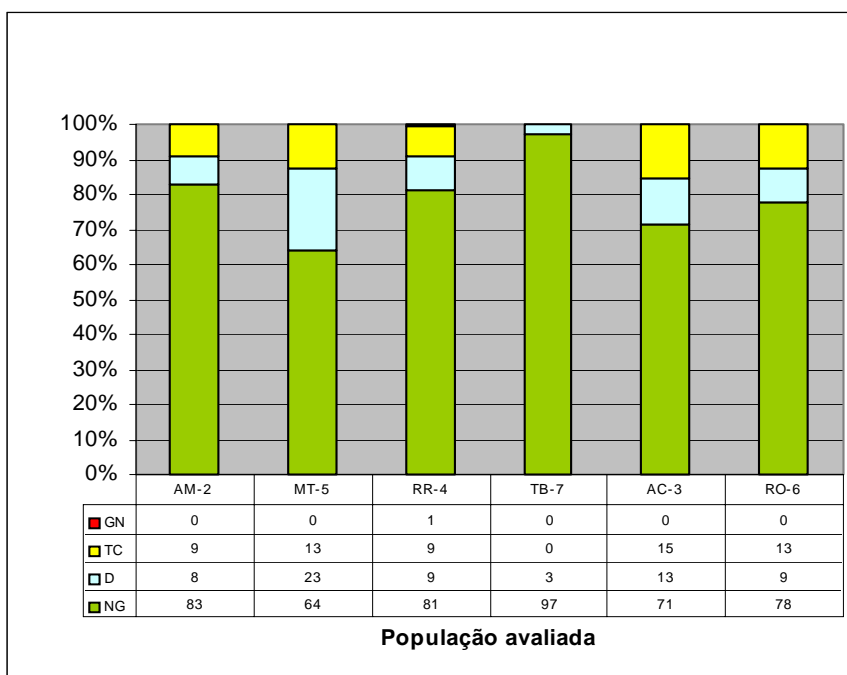


Fig. 6 – Porcentaje de ascosporos de populações de *Mycosphaerella fijiensis* que presentarón germinación normal (GN), tubo germinativo corto (TC), tubo germinativo distorcionado (D) e no germinados (NG), cuando sometidos al benomil 10 mg/l.

Los resultados de los análisis de la inhibición del crecimiento de colonias de *Mycosphaerella fijiensis* al los fungicidas propiconazole, azoxistrobina y benomil encuentran se en el Fig. 7, 8 y 9. La población más insensible a los 3 fungicidas fue la de Nobre/MT-5. Al fungicida azoxistrobina, la población de Tabatinga/TB-7 fue tan insensible cuanto la de Nobre/MT-5.

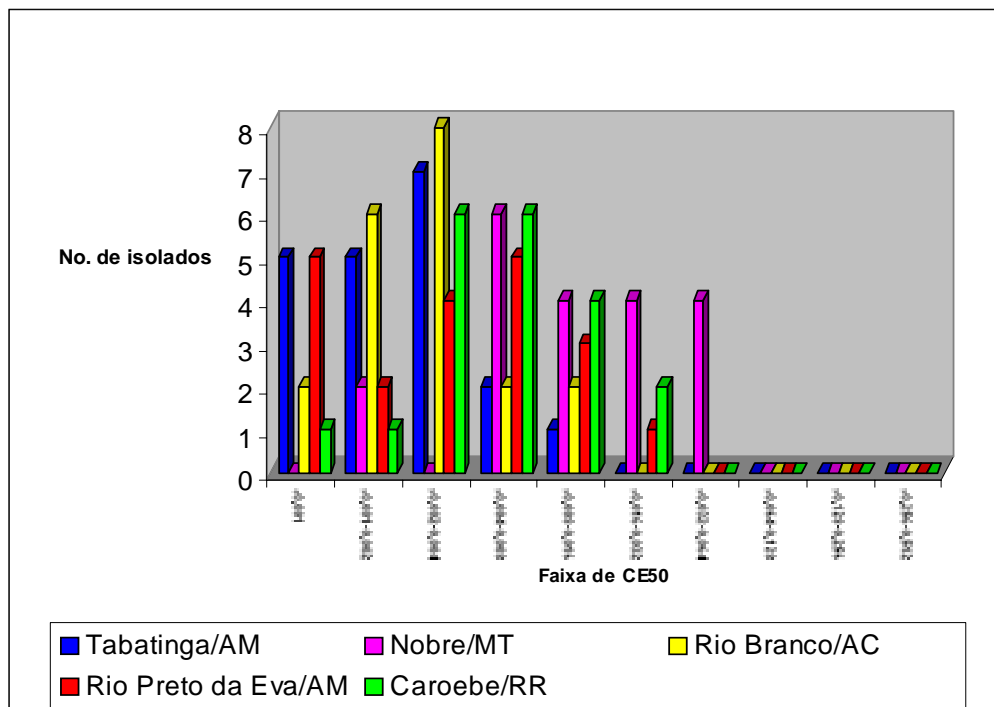


Fig. 7 – Cantidad de aislados monoascospóricos de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* sensibles por rango de EC₅₀ de propiconazole.

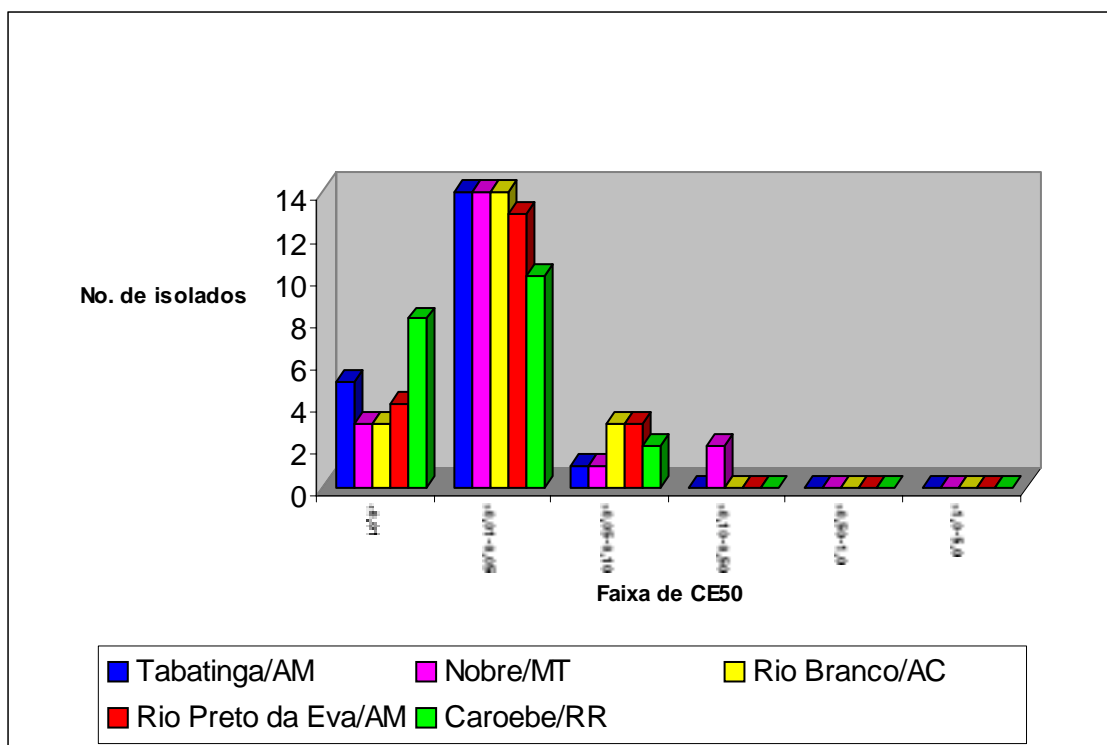


Fig. 8 – Cantidad de aislados monoascospóricos de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* sensibles por rango de CE₅₀ de azoxistrobina.

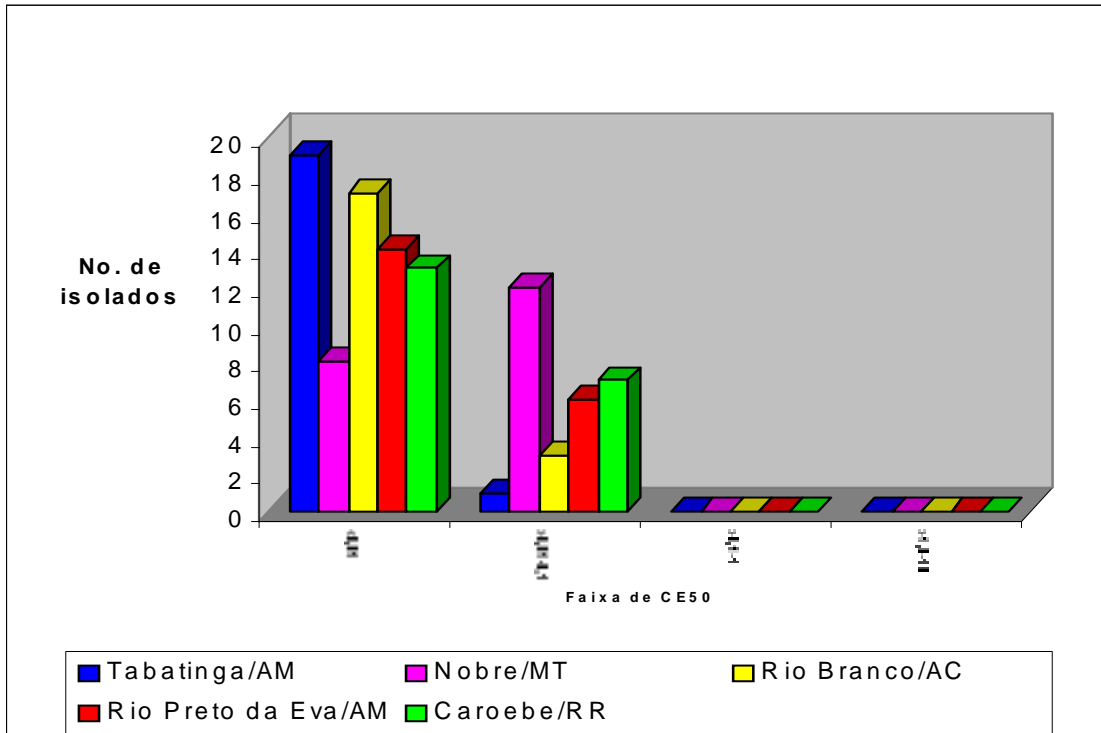


Fig. 9 – Cantidad de aislados monoascospóricos de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* sensible por rango de EC₅₀ de benomil.

Al parecer una pequeña fracción del inóculo que ingresó a Brasil podría estar con algún grado de resistencia a benomil y a propiconazole, pero no a azoxistrobina, probablemente por la presión de selección que se hizo en países vecinos. Otra explicación puede ser la presencia de mutantes silvestres con resistencia natural a esos fungicidas.

BIBLIOGRAFIA

CASTRO, O ; WANG, A & CAMPOS,L.F. Análisis in vitro de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas fenarimol, tridemorph y propiconazole. *Phytopathology* 85: 382.1995. (Resumo).

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; PEREIRA, M. C. N. & COSTA, M. M. Avaliação de fungicidas no controle da Sigatoka negra da bananeira. *Fitopatologia Brasileira* 25: 375. 2000. (Resumo).

GUZMÁN, M. & ROMERO, R. Comparación de los fungicidas azoxistrobina, propiconazole y difenoconazole en el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banana (*Musa* AAA). *Corbana* 22: 49-59.1997.

OROZCO-SANTOS, M. Critérios para el control químico de la Sigatoka negra del banano (*Mycosphaerella fijiensis*). In: CURSO DE MANEJO INTEGRADO DE SIGATOKA NEGRA. Manzanillo (México): INIFAP/INIBAP/IICA, 1998. p.1-10.

ROMEIRO, A A & SUTTON, T. B. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* , causal agent of black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology* 87: 96-100.1997.

VARGAS, V. M. M. Prevencion y manejo de la sigatoka negra. Caldas (Colômbia): ICA, 1996. 29p.

VICENTE, L. P. Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de bananas y plátanos (*Musa* ssp.) en Cuba. Biología, epidemiología y manejo integrado de la enfermedad. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL SOBRE SIGATOKA NEGRA, 1º, Colima (México), 1998. p.24-52.



FIG.1-Mapa de Brasil, los puntos marcados en rojo indican los sitios de recolecta de las muestras.