

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO GENÉTICO DE LA RESISTENCIA A LAS ESTROBILURINAS EN  
AISLAMIENTOS DE *Pseudocercospora fijiensis* DE PLANTACIONES DE  
BANANO EN COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de  
Posgrado en Biología para optar al grado de Magister Scientiae en Biología  
con énfasis en Genética y Biología Molecular

Fabiola Alfaro Alvarado

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

## **DEDICATORIA**

*A mis padres por todo el amor y apoyo que me han brindado en cada momento de mi vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la fuerza de no desfallecer y estar conmigo en todo momento.

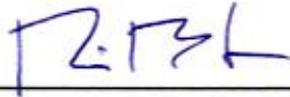
A Keiner Araya por su amor, paciencia y apoyo incondicional.

A la Corporación Bananera Nacional S.A. (CORBANA) por el apoyo institucional y económico en la realización de esta investigación.

En forma especial a los miembros del comité asesor, Dr. Sc. Agr. Andrés Gatica Arias, M.Sc. Mauricio Guzmán Quesada y Dra. Priscila Chaverri Echandi por todo su apoyo, paciencia, consejos, confianza y colaboración.

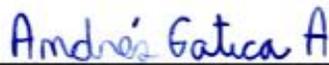
Y a todas las personas que de una u otra manera fueron partícipes de este proceso y me apoyaron, que Dios les bendiga por siempre.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular”



---

Dr. Ramiro Barrantes Mesén  
**Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado**



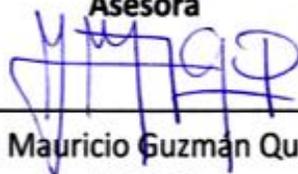
---

Dr. Andrés Gatica Arias  
**Director de Tesis**



---

Dra. Priscila Chaverri Echandi  
**Asesora**



---

M.Sc. Mauricio Guzmán Quesada  
**Asesor**



---

Dr. Federico Albertazzi Castro  
**Representante del Director  
Programa de Posgrado en Biología**



---

Fabiola Alfaro Alvarado  
**Candidata**

## TABLA DE CONTENIDO

PORTADA .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	ii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iii
TABLA DE CONTENIDO .....	iv
RESUMEN.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS .....	3
1.2 HIPÓTESIS .....	3
<b>2 REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Musáceas.....	4
2.2 Sigatoka negra.....	4
2.2.1 Distribución de la Sigatoka negra.....	5
2.2.2 Etiología.....	6
2.2.3 Desarrollo de síntomas de la enfermedad .....	8
2.2.4 Diversidad genética de <i>P. fijiensis</i> .....	9
2.2.5 Combate de la Sigatoka negra.....	10
2.3 Resistencia a fungicidas.....	16
2.3.1 Tipos de resistencia.....	18
2.3.2 Mecanismos de resistencia .....	19
2.3.3 Resistencia de <i>P. fijiensis</i> a QoI's.....	20
2.4 PCR Tiempo Real (RT PCR).....	21
<b>3 METODOLOGÍA .....</b>	<b>25</b>
3.1 Ubicación del experimento .....	25
3.2 Etapa I. Obtención de los aislamientos de <i>P. fijiensis</i> .....	25
3.2.1 Colecta de muestras.....	25
3.2.2 Descarga de ascosporas .....	26
3.2.3 Obtención de cultivos monoascospóricos .....	27
3.2.4 Conservación de los aislamientos .....	28

3.3	Etapa II. Determinación de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>P. fijiensis</i> a las estrobilurinas.....	28
3.3.1	Evaluación de la sensibilidad <i>in vitro</i> a los fungicidas azoxystrobin y pyraclostrobin (Crecimiento micelial en medio sólido).....	29
3.3.2	Diseño experimental y análisis de datos .....	29
3.4	Etapa III. Análisis molecular de la sensibilidad de <i>P. fijiensis</i> a las estrobilurinas.....	30
3.4.1	Confirmación molecular de las mutaciones G143A, F129L y G137R .....	30
3.4.2	Cuantificación relativa de la expresión del gen <i>cyt b</i> .....	31
3.5	Etapa IV. Evaluación en invernadero de la patogenicidad y virulencia de aislamientos de <i>P. fijiensis</i> con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas .....	34
3.5.1	Material experimental.....	34
3.5.2	Tratamientos .....	34
3.5.3	Inoculación de los tratamientos.....	35
3.5.4	Manejo de las plantas después de la inoculación .....	36
3.5.5	Diseño experimental y análisis de los datos.....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1	Etapa I. Obtención de los aislamientos de <i>P. fijiensis</i> .....	37
4.2	Etapa II. Determinación de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>P. fijiensis</i> a las estrobilurinas.....	38
4.3	Etapa III. Análisis molecular de la sensibilidad de <i>P. fijiensis</i> a las estrobilurinas.....	41
4.3.1	Confirmación molecular de las mutaciones G143A, F129L y G137R .....	41
4.3.2	Cuantificación de la expresión del gen <i>cyt b</i> .....	48
4.4	Etapa IV. Evaluación en invernadero de la patogenicidad y virulencia de aislamientos de <i>P. fijiensis</i> con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas .....	51
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>77</b>

## RESUMEN

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis* Morelet, es considerada la enfermedad foliar más limitante para la producción de banano y plátano a nivel mundial y de mayor impacto económico para la industria de banano de exportación. El combate químico ha sido la principal herramienta de manejo de esta enfermedad, no obstante, debido a la fuerte presión de selección ejercida sobre las poblaciones del patógeno y por el uso frecuente de los mismos ingredientes activos, el hongo ha desarrollado resistencia a los principales fungicidas sitio-específicos liberados al mercado, entre estos a los inhibidores externos de la quinona (QoI's), también conocidos como estrobilurinas. Como consecuencia del desarrollo de resistencia, se ha aumentado el número de aplicaciones de fungicidas de acción multisitio, con el consiguiente incremento en el costo de combate de la enfermedad y del riesgo hacia el ambiente y la salud. Con el objetivo de conocer con más detalle las bases genéticas de la resistencia de *P. fijiensis* a las estrobilurinas se procedió a determinar el grado de sensibilidad *in vitro* de sesenta y cinco aislamientos del patógeno (55 de fincas comerciales y 10 de una población silvestre) a azoxystrobin y pyraclostrobin. Posteriormente, mediante secuenciación se identificó en los aislamientos de *P. fijiensis* la presencia o ausencia de las mutaciones G143A, F129L y G137R asociadas con la pérdida de sensibilidad de diferentes hongos fitopatógenos a las estrobilurinas. Además, mediante retrotranscripción y PCR en tiempo real se cuantificó la expresión relativa del gen en 2 aislamientos sensibles y 8 aislamientos resistentes a este grupo de fungicidas. Finalmente, en condiciones de invernadero se evaluó la patogenicidad y virulencia de cinco aislamientos de *P. fijiensis* sensibles (G143) y cinco resistentes (G143) a las estrobilurinas. Al determinar el grado de sensibilidad *in vitro* a las estrobilurinas se corroboró la pérdida de sensibilidad a azoxystrobin y pyraclostrobin en aislamientos de *P. fijiensis* de plantaciones bananeras de Costa Rica. Asimismo, se logró identificar la resistencia cruzada entre estos. Mediante la evaluación molecular del gen *cyt b*, se logró identificar la mutación G143A en el 100 % de los aislamientos de fincas comerciales que mostraron una pérdida de sensibilidad *in vitro* a las estrobilurinas, lo que revela una clara relación entre ésta y la resistencia a este grupo de fungicidas en *P. fijiensis*. Por otra parte, las mutaciones G137R y F129L no se encontraron en ninguno de los aislamientos, sugiriendo la no existencia de éstas para *P. fijiensis* y aún menos su posible relación con la resistencia a estrobilurinas en este patógeno. Además se logró cuantificar una sobreexpresión del gen *cyt b* en los aislamientos de *P. fijiensis* con pérdida de sensibilidad *in vitro* a las estrobilurinas, lo que revela que posiblemente éste mecanismo molecular también esté involucrado en la resistencia de *P. fijiensis* a esta familia de fungicidas. Finalmente, en condiciones de invernadero, se comprobó que todos los aislamientos de *P. fijiensis* fueron patogénicos. Sin embargo, los aislamientos resistentes mostraron una virulencia igual o superior a los aislamientos sensibles. La información generada en la presente investigación aporta información valiosa en el conocimiento de la genética de la resistencia de *P. fijiensis* a las estrobilurinas. Información que podría ser utilizada para monitorear molecularmente la resistencia a las estrobilurinas en las poblaciones del patógeno y contribuir al diseño de programas de combate de la enfermedad más eficientes.

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Recomendaciones del uso de fungicidas sistémicos en el combate de la Sigatoka negra del banano (FRAC 2018).....	13
<b>Cuadro 2.</b> Principales grupos de fungicidas utilizados en el combate de la Sigatoka negra y su riesgo en el desarrollo de resistencia por parte del patógeno (FRAC 2018). ....	14
<b>Cuadro 3.</b> Composición del medio Agar Papa Dextrosa (PDA). ....	27
<b>Cuadro 4.</b> Composición del medio de jugo de vegetales V8®.....	29
<b>Cuadro 5.</b> Secuencias nucleotídicas de los iniciadores utilizados en la q-RT-PCR y el tamaño de los fragmentos amplificados.....	33
<b>Cuadro 6.</b> Detalle de los aislamientos de <i>P. fijiensis</i> , con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas, evaluados en invernadero.....	35
<b>Cuadro 7.</b> Lista de aislamientos monoascospóricos de <i>P. fijiensis</i> obtenidos de 10 fincas comerciales y una plantación testigo.....	37
<b>Cuadro 8.</b> Valores de CE <sub>50</sub> (mg/L) promedio, mínimos, máximos y factor de resistencia de los aislamientos monoascospóricos de <i>P. fijiensis</i> para azoxystrobin y pyraclostrobin. ....	40
<b>Cuadro 9.</b> Distribución de los aislamientos de <i>P. fijiensis</i> según su valor de CE <sub>50</sub> para azoxystrobin y pyraclostrobin. ....	41
<b>Cuadro 10.</b> Resultados de la cuantificación de ADN de los aislamientos de <i>P. fijiensis</i> . ....	42
<b>Cuadro 11.</b> Cantidad y calidad del ARN extraído de aislamientos de <i>P. fijiensis</i> . ....	48
<b>Cuadro 12.</b> Variables: período de incubación, período de evolución de los síntomas y período infeccioso de aislamientos de <i>P. fijiensis</i> con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas...	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de infección de Sigatoka negra. Fuente: Gómez (2013).....	7
<b>Figura 2.</b> Estados de desarrollo de los síntomas de Sigatoka negra de acuerdo a la escala de Fouré (1985): (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. Fuente: Murillo (2015). .....	8
<b>Figura 3.</b> Cadena de transporte electrónico mitocondrial. Fuente: Fernández <i>et al.</i> (2008). .....	16
<b>Figura 4.</b> Área en producción bananera de Costa Rica y ubicación de fincas muestreadas. Fuente: CORBANA (2018). .....	26
<b>Figura 5.</b> Ascosporas de <i>P. fijiensis</i> . A) Sin germinar (Aumento 10 X) y B) Germinadas (Aumento 4X). Nótese la emisión de los tubos germinativos de cada célula de la ascospora. ....	27
<b>Figura 6.</b> Vista superior e inferior del crecimiento típico de dos cultivos monoascospóricos de <i>P. fijiensis</i> con 10 días de crecimiento en medio PDA a 27 °C y en oscuridad. ....	28
<b>Figura 7.</b> Metodología de inoculación de los aislamientos de <i>P. fijiensis</i> . .....	35
<b>Figura 8.</b> Metodología de conservación de aislamientos de <i>P. fijiensis</i> . (A) Vial e inclinación del medio utilizado para la siembra del hongo (PDA), (B) Crecimiento del hongo al sellar el vial con membrana millipore y (C) Cultivo listo para conservar. ....	38
<b>Figura 9.</b> Sensibilidad <i>in vitro</i> de aislamientos monoascospóricos de <i>P. fijiensis</i> a pyraclostrobin y azoxystrobin de una población silvestre (A) y de 11 fincas comerciales de banano (B) en Costa Rica. ....	39
<b>Figura 10.</b> Análisis de correlación entre los valores de CE <sub>50</sub> de los fungicidas azoxystrobin y pyraclostrobin en aislamientos monoascospóricos de <i>P. fijiensis</i> . ....	40
<b>Figura 11.</b> ADN de 65 aislamientos de <i>P. fijiensis</i> . Gel de agarosa al 1 %. .....	44
<b>Figura 12.</b> Amplificación de un fragmento del gen <i>cyt b</i> de aproximadamente 285 pb de 65 aislamientos de <i>P. fijiensis</i> . Gel de agarosa al 1 % 83 V por 45 minutos. ....	45
<b>Figura 13.</b> Alineamiento de secuencias traducidas del gen codificante del citocromo b en <i>P. fijiensis</i> para el segmento comprendido entre los aminoácidos 125 y 150. Nótese la presencia de la mutación G143A y la ausencia de las mutaciones F129L y G137R. ....	47
<b>Figura 14.</b> Distribución de los aislamientos de <i>P. fijiensis</i> según su sensibilidad a azoxystrobin y pyraclostrobin y por ausencia o presencia de la mutación G143A. ....	47
<b>Figura 15.</b> Extracción de ARN de <i>P. fijiensis</i> según el protocolo propuesto por Islas <i>et al.</i> (2006) y tratadas con el kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific). (1) Gene Ruler 100 pb Plus DNA Ladder-ready to use (Fermentas), (2) ZTSC 3, (3) ZTSC 27, (4) ZTSC 30, (5) Rebusca 3, (6) Encantos 10, (7) San Pablo 2, (8) Estrellales 3, (9) Encantos 5, (10) Sincelejo 2, (11) La Teresa 1 y (12) Platanera 3. Gel desnaturalizante de agarosa al 1,2 % con formaldehído al 37 % teñido con GelRed™. ....	48

**Figura 16.** Curva de fusión de los genes *cyt b* (A) y actina (B). Se observa la amplificación de específica de un solo producto de PCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas. . 49

**Figura 17.** Evaluación de la eficiencias de las reacciones en la amplificación del gen *cyt b*. (A) y actina (B). ..... 50

**Figura 18.** Expresión relativa del gen *cyt b* en diez aislamientos de *P. fijiensis* con diferente nivel de resistencia a QoI's. Expresión relativa fue normalizada con el gen de la actina de *P. fijiensis*. Los datos representan el promedio de una repetición biológica con tres repeticiones técnicas..... 51

**Figura 19.** Síntomas de Sigatoka negra observadas después de 75 días de inoculación de los diferentes aislamientos de *P. fijiensis*. ..... 52

**Figura 20.** Curva de infección de 10 aislamientos de *P. fijiensis*, con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas, inoculados en condiciones de invernadero. .... 52

**Figura 21.** Valor promedio de área bajo la curva (ABC) del índice de infección de 10 aislamientos *P. fijiensis* con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas inoculados en condiciones de invernadero. Valores con una misma letra no son diferentes estadísticamente (DMS, P= 0,05). ... 55



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Fabiola Alfaro Alvarado, con cédula de identidad 1-1394-0049, en mi condición de autor del TFG titulado Estudio genético de la resistencia a las estrobilurinas en aislamientos de Pseudocercospora fijiensis de plantaciones de banano en Costa Rica

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo: Fabiola Alfaro Alvarado

Número de Carné: A70183 Número de cédula: 1-1394-0049

Correo Electrónico: falfaroalvarado@gmail.com

Fecha: 27/09/2019 Número de teléfono: 8323-05-74

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Dr. Andrés Gatica Arias

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## 1 INTRODUCCIÓN

La producción de banano se ha desarrollado a nivel mundial, principalmente en América Latina y el Caribe, Asia y África. La región de América Latina y el Caribe produce el 90 % del banano que se comercializa en el mundo. Para ello se requiere el uso de alta tecnología e insumos agrícolas como fertilizantes, insecticidas, nematicidas, herbicidas y fungicidas (Frison y Sharrock 1999, Guzmán *et al.* 2013).

En Costa Rica la producción y exportación del banano se inició hace más de 100 años y actualmente, es uno de los principales países productores gracias a una productividad promedio en el año 2018 de 2.894 cajas por hectárea, una de las más altas a nivel mundial (CORBANA 2019). Esto unido a un área de siembra de 43.050 hectáreas, le permitió alcanzar en el año 2018 una producción total de cerca de 125 millones de cajas y percibir US\$1024,1 millones (CORBANA 2019), lo que le da al banano un posicionamiento privilegiado en el ámbito agrícola nacional y lo identifica como un motor de desarrollo económico y social.

Los cultivares utilizados actualmente son de muy alto potencial productivo, pero a la vez, muy susceptibles al ataque de plagas y enfermedades. La Sigatoka negra, causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis* Morelet, es considerada la enfermedad foliar más limitante para la producción de bananos y plátanos a nivel mundial y de mayor impacto económico para la industria de banano de exportación (Stover y Simmonds 1987, Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003, Pérez *et al.* 2003, Romero y Guzmán 2006). La Sigatoka negra no causa una muerte súbita de la planta, ni tampoco la destruye en su totalidad; la importancia de la misma reside en su capacidad para alcanzar el 100 % de incidencia y su marcado impacto sobre la producción y la calidad (Guzmán 2006, Marín *et al.* 2003, Rodríguez y Cayón 2008).

*Pseudocercospora fijiensis* infecta las hojas en sus primeras etapas de desarrollo y evoluciona rápidamente hasta la aparición de manchas necróticas, lo que culmina en un rápido deterioro del área foliar que afecta el crecimiento y productividad de la planta al disminuir la capacidad fotosintética; también puede inducir la maduración prematura de los racimos (Rodríguez y Cayón 2008, Stover y Simmonds 1987, Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003, Guzmán 2006, Romero y Guzmán 2006, Chillet *et al.* 2008). 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; Guzmán 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, *P. 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; Romero y Sutton 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 *P. 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 (1982) 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. *Pseudocercospora 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).

Actualmente, cuando la sostenibilidad económica, técnica y ambiental se convierte en el reto principal de la agricultura moderna, es imprescindible profundizar en los progresos mundiales para evitar el desarrollo de la resistencia a los fungicidas. Un monitoreo continuo y preciso proporciona información sobre la susceptibilidad de las poblaciones y permite realizar un seguimiento de la evolución de genes de resistencia (Guzmán *et al.* 2013, Silveira *et al.* 2014). Con base en lo anterior, mediante este estudio se busca conocer con más detalle las bases genéticas de la resistencia asociada a las estrobilurinas y así generar información básica de aislamientos con diferente grado de resistencia a este grupo de fungicidas, distribuidos en el territorio nacional, que pueda ser utilizada para monitorear las poblaciones del patógeno en el medio y en el diseño de programas de combate de la enfermedad.

## 1.1 OBJETIVOS

### Objetivo general

Analizar la genética de la resistencia a las estrobilurinas en aislamientos de *Pseudocercospora fijiensis* de plantaciones de banano en Costa Rica.

### Objetivos específicos

1. Evaluar la sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *P. fijiensis* provenientes de doce plantaciones bananeras de Costa Rica a los fungicidas azoxystrobin y pyraclostrobin.
2. Identificar mediante secuenciación la presencia de las mutaciones G143A, F129L y G137R en el gen *cyt b* en aislamientos de *P. fijiensis* con diferente grado de sensibilidad *in vitro* a los fungicidas azoxystrobin y pyraclostrobin.
3. Cuantificar en forma relativa la expresión del gen *cyt b* en aislamientos de *P. fijiensis* con diferente grado de sensibilidad *in vitro* a los fungicidas azoxystrobin y pyraclostrobin.
4. Evaluar en invernadero la patogenicidad y virulencia de aislamientos de *P. fijiensis* con diferente grado de sensibilidad *in vitro* a los fungicidas azoxystrobin y pyraclostrobin.

## 1.2 HIPÓTESIS

La pérdida de sensibilidad de aislamientos de *P. fijiensis* a las estrobilurinas está asociado a la mutación G143A en el gen *cyt b* y esto genera alteraciones en la eficacia biológica del patógeno.

## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Musáceas

Los bananos y plátanos son monocotiledoneas del género *Musa* (Familia: Musaceae, orden: Zingiberales). Su centro de origen se ubica en el sur-este asiático (India a Polinesia) y su centro de distribución, en Malasia o Indonesia, aunque están ampliamente adaptadas a regiones tropicales y subtropicales. Son plantas herbáceas gigantes, poliploides, perennes, con pseudotallo aéreo no lignificado que puede alcanzar más de 3 metros de altura (Champion 1986, Stover y Simonds 1987, Soto 1992, Sandoval y Muller 1999, Manzo *et al.* 2005, Heslop-Harrison y Schwaracher 2007).

Al día de hoy se han reconocido más de cien cultivares, derivados de cruces inter e intraespecíficos entre dos especies silvestres diploides *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB); de estos cruces surgen diploides, triploides y tetraploides. Muchas de las musáceas domesticadas que son triploides ( $22n=3x=33$ ), con una constitución de AAA (mayoría de banano dulce), AAB o ABB (mayoría pero no exclusivo de los plátanos y bananos de cocción), (Champion 1986, Stover y Simonds 1987, Robinson 1996, Heslop-Harrison y Schwaracher 2007).

En países en desarrollo el banano representa el cuarto cultivo de mayor importancia, con una producción aproximada a las 100 millones de toneladas métricas, se siembra en todo el trópico húmedo y en los subtrópicos de las Américas, África y Asia (Stover y Simonds 1987, Robinson 1996, Heslop-Harrison y Schwaracher 2007). El banano es la fruta fresca más exportada del mundo en cuanto a volumen y valor (Arias *et al.* 2004). Según Manzo *et al.* (2005) el banano es el segundo frutal tropical más importante por su consumo mundial y por su contenido de carbono, almidón, vitaminas y minerales. Según Arias *et al.* (2004) los países de América Latina son los principales exportadores de fruta fresca hacia Estados Unidos y Europa.

### 2.2 Sigatoka negra

La Sigatoka negra es la enfermedad más destructiva que ataca el follaje del género *Musa* y es considerada como el problema fitosanitario de las musáceas de mayor impacto económico en la producción de banano nivel mundial (Stover 1987, Meredith y Lawrence 1969, Jones 2000, Marín *et al.* 2003). 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 (Guzmán *et al.* 2013). La enfermedad es causada por el hongo ascomyceto

*Pseudocercospora fijiensis* Morelet (antes conocido como *Mycosphaerella fijiensis* Morelet) (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).

La enfermedad provoca la pérdida prematura de gran parte de superficie foliar (incluso de toda la hoja), lo que conlleva a una disminución en la tasa fotosintética, que da como resultado retardos en la madurez fisiológica normal, racimos más pequeños de lo normal, dedos pequeños y angulares, y una maduración prematura antes de la cosecha. Además, la Sigatoka negra retrasa el crecimiento vegetativo de la planta y sus hijos y el promedio de emergencia de hojas nuevas (Stover y Simmonds 1987, Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003, Guzmán 2006, Romero y Guzmán 2006, Chillet *et al.* 2008). *Pseudocercospora fijiensis* se disemina por el aire y se propaga principalmente en las regiones de las tierras bajas, donde se cultiva el plátano y el banano (Kitume 2002). La incidencia y severidad de la enfermedad se ven condicionados por la interacción entre el patógeno, la susceptibilidad del cultivar y factores climáticos como precipitación, humedad relativa y temperatura (Stover 1980, Marín *et al.* 2003, Orozco *et al.* 2013).

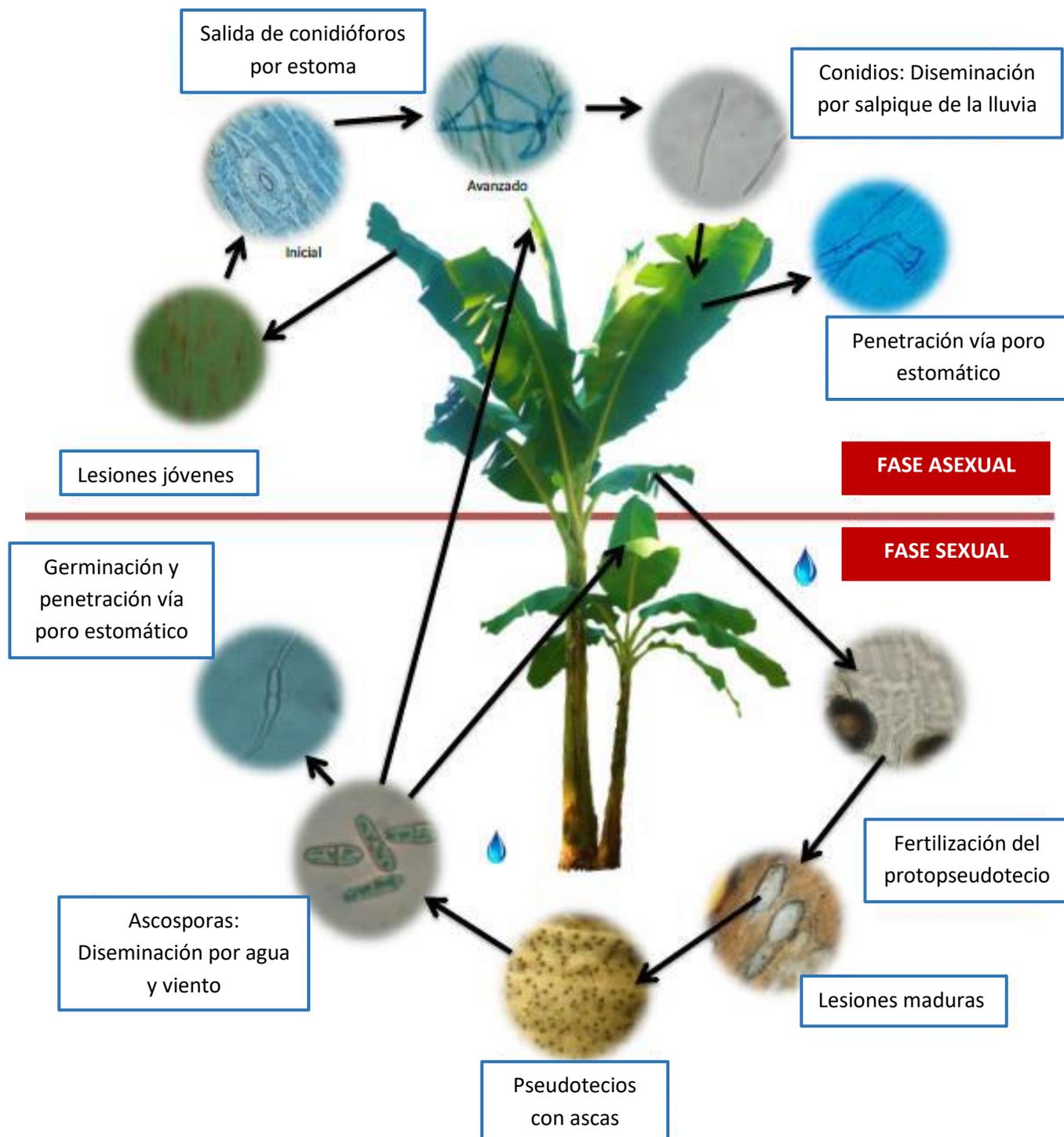
### **2.2.1 Distribución de la Sigatoka negra**

El centro de origen y distribución de la Sigatoka negra se encontró en Asia y de ahí se propagó al resto del mundo (Stover 1980). El primer lugar donde se encontró *P. fijiensis* fuera de su centro de origen, fue Honduras en el año 1972, apareció luego en Zambia en 1973 y en Gambia en 1979. Actualmente, la enfermedad se ha diseminado por casi todos los países del continente americano, ubicados entre el trópico de Cáncer y el trópico de Capricornio. Hacia el norte la enfermedad ha llegado hasta México (1980) y la península de la Florida (1998) y hacia el sur hasta Bolivia (1996) y Brasil (1998). En Guyana apareció en el 2009 y se ha dispersado en todo el país, incluido el borde fronterizo con Surinam donde aún no han informado oficialmente la presencia de la enfermedad. Los países y territorios de países en el Caribe, a pesar de su condición de islas, no han podido escapar a la enfermedad. A partir de la década de los 90s, la Sigatoka negra se dispersó por el Caribe; apareció en Cuba en 1990, Jamaica en 1995, República Dominicana en 1996 y Puerto Rico en el 2004. En el sur del mar Caribe su primer registro fue en Trinidad y Tobago en el 2005 y San Vicente en el año 2009. En el 2010 fue detectada en las islas de Santa Lucía y Martinica, así como en Dominica y Guadalupe en el 2012 (Guzmán *et al.* 2013).

### 2.2.2 Etiología

Este hongo causal de la Sigatoka negra se caracteriza por presentar dos formas reproductivas claramente diferenciadas en su fase asexual y sexual. Esto le proporciona una amplia capacidad de infección y mayor plasticidad genética, gracias a la recombinación (Barrios 2006). La fase asexual (*P. fijiensis*) genera conidios que son liberados desde los conidióforos a partir de las primeras lesiones de la enfermedad (pizcas o estrías) (Figura 1). Los conidios se producen principalmente durante periodos de alta humedad y en presencia de una película de agua libre sobre la hoja. Su diseminación es, principalmente, por medio del salpique de la lluvia y el escurrimiento del agua por la superficie de la hoja, por lo que este proceso se asocia con infecciones a corta distancia, entre las hojas de la misma planta, de la planta madre a los hijos y entre plantas cercanas (Guzmán 2003, Orozco *et al.* 2013).

La fase sexual aparece en el centro de las lesiones, a medida que se van secando aparecen las estructuras de reproducción llamadas pseudotecios (cuerpos fructíferos del hongo), los cuales contienen ascas con ascosporas. Las ascosporas son liberadas y trasladadas por el viento a más de 50 Km de distancia, por lo que son la principal forma de dispersión a largas distancias (Stover 1980, Ortiz *et al.* 2001, Guzmán 2003) (Figura 1). Los conidios y las ascosporas infectan la hoja vía estomas y estos son más abundantes en la superficie abaxial de las mismas (Lorenzo *et al.* 1978, Flores *et al.* 1985, Guzmán 2003, Orozco *et al.* 2013), por cada estoma ubicado en el haz se encuentran tres a seis en el envés. Guzmán (2003) menciona que, para germinar e infectar el tejido, tanto conidios como ascosporas, requieren una alta humedad relativa (92-100 %) para conidios y (98-100 %) para ascosporas, y de temperaturas que oscilen en un rango de 26,5-28 °C.

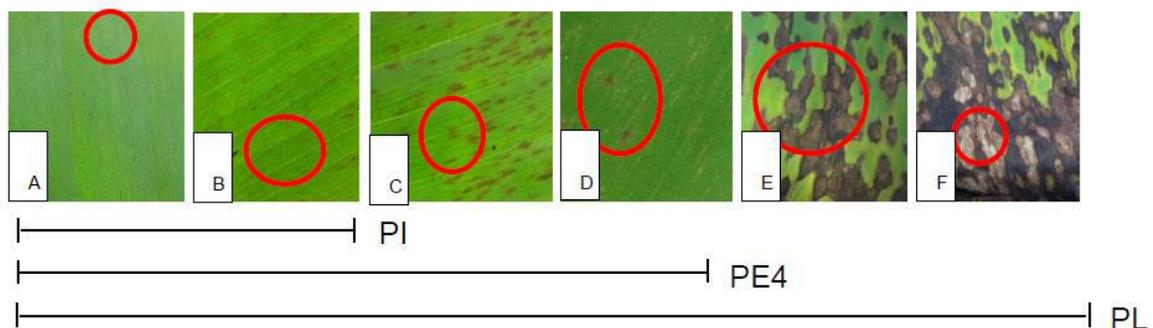


**Figura 1.** Ciclo de infección de Sigatoka negra. Fuente: Gómez (2013).

### 2.2.3 Desarrollo de síntomas de la enfermedad

En la actualidad, se han reconocido seis estados de los síntomas de la enfermedad después de la germinación de las ascosporas y la penetración de las hifas por los estomas de las hojas: tres de raya, una de transición y dos de mancha (Meredith y Lawrence 1969, Fouré 1985, Marín *et al.* 2003, Orozco *et al.* 2013). En el estado 1, aparecen pequeñas puntuaciones de color amarillo pálido de 0,25 mm de diámetro que son visibles solo por el envés de la hoja; en el estado 2 los puntos se alargan como rayas de 1 mm de ancho por 2 mm de largo, generalmente de color castaño y son apenas visibles por el haz. El estado 3 se caracteriza por que las rayas se alargan hasta alcanzar 20-25 mm de longitud y 2 mm de ancho, además, toman una coloración marrón oscuro y son claramente visibles sobre el haz como rayas amarillas y café claras. En el estado 4, sobre el envés, las rayas se ensanchan, se tornan de un color marrón oscuro y pueden o no ser rodeadas por una zona amarilla pálida, este puede considerarse el primer estado de mancha. En el estado 5 los centros de color negro de las manchas empiezan a colapsarse, mientras rodean el tejido con un halo amarillo y finalmente el estado 6 se caracteriza por que los centros de las manchas secas se tornan color gris claro y son rodeadas por un anillo negro bien definido, el cual también es a su vez rodeado por un halo amarillo (Fouré 1985, Marín *et al.* 2003, Orozco *et al.* 2013) (Figura 2).

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).



**Figura 2.** Estados de desarrollo de los síntomas de Sigatoka negra de acuerdo a la escala de Fouré (1985): (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. Fuente: Murillo (2015).

#### **2.2.4 Diversidad genética de *P. fijiensis***

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

Dentro de los estudios de Carlier *et al.* (1996) citado por Chong y Rodríguez (2007) examinaron y analizaron la estructura genética de *P. fijiensis*, identificando grandes diferencias genéticas en las poblaciones estudiadas. La mayor diversidad genética fue encontrada en poblaciones analizadas de Papúa, 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 Papúa y Filipinas pero mostraban una menor diversidad genética. Igualmente Carlier *et al.* (1996) citados por Rivas *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 *P. 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 *P. fijiensis* puede mostrar gran diversidad genética en pequeña escala, encontrando grandes diferencias genéticas en un mismo campo.

Rivas *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 *et al.* (2003) el hecho de observar efectos de fundación en la estructura genética de *P. 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 *P. 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 *P. fijiensis* con manejo orgánico eran muy cercanas genéticamente a una población silvestre y no así una de manejo convencional con la silvestre (Chong y Rodríguez 2007).

### **2.2.5 Combate de la Sigatoka negra**

El combate químico ha sido la principal herramienta en el manejo de la Sigatoka negra y se realiza mediante la aplicación alterna y en mezcla de fungicidas protectores y sistémicos (Marín *et al.* 2003, Guzmán 2006, Rodríguez y Cayón 2008, Scot 2008, Guzmán *et al.* 2013). Los fungicidas protectores se caracterizan por ser productos de contacto que permanecen y ejercen su acción únicamente sobre la superficie donde se aplican; éstos son de acción multisitio y por ende, presentan un bajo o nulo riesgo de generar resistencia. Por otra parte, los fungicidas sistémicos logran penetrar la hoja y movilizarse a través de la misma ejerciendo su acción tóxica sobre el hongo. Estos productos son de acción sitio-específico y en consecuencia presentan riesgo de generar resistencia en el patógeno (Pérez *et al.* 2003, Lapeyre *et al.* 2010, Orozco *et al.* 2013).

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 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).

#### **2.2.5.1 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). *Pseudocercospora 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, Orozco *et al.* 2013).

#### **2.2.5.2 Fungicidas sistémicos**

El uso de fungicidas sistémicos son los más importantes en el control de la Sigatoka negra (Guzmán *et al.* 2013). Ganry *et al.* (2012) indican 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 (Pérez 2006).

Los grupos de fungicidas sistémicos más utilizados para el control de *P. fijiensis* son: benzimidazoles, triazoles, estrobirulinas (Marín *et al.* 2003, Pérez 2006 y 2012, Guzmán *et al.* 2013), aminas, carboxamidas, anilinopyrimidinas 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 (FRAC 2018).

Clase química	Solo o en mezcla	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 prefiere 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 (QoI)	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-Fenilcarbamatos	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 en mezclas	No hay restricciones	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 (FRAC 2018).

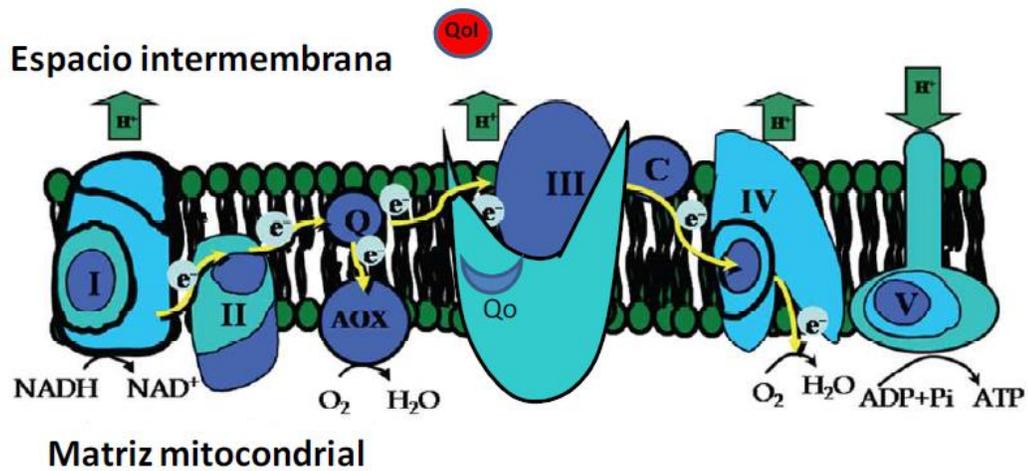
Sitio de acción	Nombre del grupo	Grupo Químico	Ingredientes activos	Riesgo de Resistencia	Comentarios	
A: Mitosis y División celular	A1: $\beta$ -tubulina en la mitosis.	MCB (Metil Benzimidazol Carbamatos)	Benzimidazoles	Benomil Carbendazina Fuberidazole	Alto riesgo	Resistencia en varias especies de hongos. RC con los i.a del mismo grupo y RCN con N-phenyl carbamatos. Resistencia conocida, presenta RCN con benzimidazoles
	A2: $\beta$ -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	Azoxysronin Pyraclostrobin Trifloxistrobin Entre otros	Alto riesgo	Resistencia en muchos patógenos por mutaciones en el gen del cyt b. RC entre fungicidas del mismo grupo Resistencia en varios
	B2: Complejo II: Succinato-dehydrogenasa	SDHI (Inhibidores de Succinato dehydrogenasa)	Pyrimidina-Carboxamida	Boscalid	Medio Riesgo	patógenos por mutaciones en el gen sdh
C: Síntesis de proteínas y aminoácidos	Biosíntesis de metionina	Anilino-Pyrimidinas	Anilino-Pyrimidinas	Cyprodinil Mepanipyrim Pyrimetanil	Medio Riesgo	Resistencia en Botrytis, Venturia y espadicamente 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 Difenoconazole Epoconazole 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: $\Delta$ 14-reductasa y $\Delta$ 8- $\Delta$ 7-isomerasa en la biosíntesis de esteroides	Aminas (morfolinas)	Morfolinas Spiroketal-aminas	Aldimorph Dodemorph Fenpropimorph Tridemorph Spiroxamina	Bajo riesgo	Decrecimiento en la sensibilidad de Mildiú polvoso. RC dentro del mismo grupo pero no con otros SBI.

### 2.2.5.2.1 Inhibidores Qo (QoI)

Las estrobilurinas son fungicidas muy eficaces, de amplio uso agrícola, de origen natural y derivados del ácido  $\beta$ - metoxiacrílico, como la estrobilurina A, producida por los hongos basidiomicetos *Strobilurus tenacellus*, *Mycena galopoda* y *M. viridimarginata* (Gisi *et al.* 2002). Este grupo representa el mayor desarrollo de fungicidas realizado a partir de un producto natural de origen fúngico. Basándose en el compuesto originario, en la actualidad se distinguen 8 clases de estrobilurinas, todas con el mismo mecanismo de acción, que incluyen 13 compuestos diferentes (Fernández *et al.* 2008). Las estrobilurinas fueron aisladas por primera en Checoslovaquia en los años 60, aunque fue en los años 80 cuando ICI Agrochemicals (actualmente Syngenta) empezó a sintetizarlas y experimentar hasta lanzar al mercado el azoxystrobin en 1992. Desde entonces se han incluido dentro de los fungicidas agrícolas más vendidos en todo el mundo (Bellón 2014). Las 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 (Pérez 2006, Ramírez *et al.* 2009).

El mecanismo de acción de las estrobilurinas se basa en la inhibición de la respiración mitocondrial, actuando en el sitio de oxidación del ubiquinol (Qo), de ahí que se conozcan con el nombre de inhibidores Qo (QoI's). Este Qo se encuentra en el citocromo  $bc_1$  ( $CYTBC_1$ ), también conocido como complejo III o ubiquinona–citocromo c oxidorreductasa (Brasseur *et al.* 1996, Gisi *et al.* 2002). El  $CYTBC_1$  está formado por el citocromo  $b$  ( $cyt b$ ), citocromo  $c_1$  ( $cyt c_1$ ) y dominios de la sulfo-proteína de Rieske ( $ISP$ ). La inhibición de la respiración mitocondrial se logra mediante el bloqueo del transporte de electrones entre el citocromo  $b$  ( $cyt b$ ) y citocromo  $c_1$  ( $cyt c_1$ ), que en consecuencia conduce a una interrupción del ciclo de energía suspendiendo la producción de ATP, que constituye el principal vector de intercambio energético para los procesos vitales de la célula (Figura 3) (Anke 1995, Brasseur *et al.* 1996, Gisi *et al.* 2002). Esto conlleva a la interrupción de funciones básicas celulares como la síntesis de proteínas, ARN y ADN debido a la deficiencia en ATP. Además, el bloqueo de la respiración genera electrones en estado de alta energía que

provocan una rápida parición de especies reactivas de oxígeno, que hacen que las estrobilurinas tengan mayor eficacia (Hollomon y Wheeler 2002, Grasso 2005, Fernández *et al.* 2008).



**Figura 3.** Cadena de transporte electrónico mitocondrial. Fuente: Fernández *et al.* (2008).

### 2.3 Resistencia a fungicidas

La resistencia se define como “la habilidad desarrollada por un hongo para sobrevivir y seguir reproduciéndose en presencia de una cantidad de fungicida que previamente fue nociva o fatal”, siendo esto un factor crítico que limita la eficiencia de los programas de manejo integrado del hongo, al incrementar dosis o frecuencias de aplicaciones (Dekker 1982, Köller 2000, Damicone 2004, Canto 2012, Castillo *et al.* 2012). 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 fungicidas) 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 (1982) menciona que la resistencia a los fungicidas 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 fungicidas. 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 (2003), 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 la última década, debido al uso intensivo de fungicidas, se han reportado casos de pérdida de sensibilidad de *P. fijiensis* a la mayoría de ingredientes activos liberados al mercado en condiciones de campo en Costa Rica, Panamá, Guatemala, Colombia, Ecuador, Honduras y Belice (FRAC 2018). La pérdida de sensibilidad del hongo ha conllevado progresivamente a un aumento en el número de aplicaciones anuales de fungicidas en las zonas bananeras. Según datos de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) en Costa Rica, bajo un manejo integrado, el uso de fungicidas para el combate de la Sigatoka negra ha aumentado de 70 kg i.a./ha/año para el año 2011 a 87 kg i.a./ha/año en el 2017, lo que a su vez ha elevado el costo de combate de la enfermedad (hasta \$2.500 ha/año) con el consiguiente mayor impacto negativo en el ambiente

y en la salud, no solo en el área aplicada sino en los ecosistemas cercanos (Romero y Sutton 1998, Sierotzki *et al.* 2000a, Sánchez *et al.* 2002, Pérez *et al.* 2003, Guzmán 2006, Romero 2006, Guzmán *et al.* 2013, CORBANA 2019).

### **2.3.1 Tipos de resistencia**

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

#### **2.3.1.1 Resistencia de un solo paso o disruptiva**

La resistencia de un solo paso o disruptiva ocurre 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).

#### **2.3.1.2 Resistencia paso a paso o progresiva**

En este tipo de resistencia se ven involucrados de manera gradual varios genes. 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).

#### **2.3.1.3 Resistencia cruzada**

Según Georgopoulos (1982), 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 (1982) 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.

#### **2.3.1.4 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).

#### **2.3.2 Mecanismos de resistencia**

En la actualidad, 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, inactivación de enzimas, variaciones en la expresión génica, 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) (Georgopoulos 1982, Selim 2009, Scnabel y Jones 2000, Reiman y Deising 2005, y Brent y Hollomon 2007).

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 la misma manera, Reiman y Deising (2005), lograron comprobar una sobreexpresión génica en aislamientos de *Pyrenophora tritici-repentis* resistentes a DMI's comparado con aislamientos silvestres del patógeno. Asimismo, en aislamientos de *P. fijiensis*, Chong (2016) comprobó la presencia de mutaciones puntuales asociadas a la pérdida de sensibilidad del patógeno a los

fungicidas DMI's. Además, demostró la existencia de una correlación entre el grado de resistencia del hongo y la expresión del gen CYP51, lo que podría contribuir al diseño de programas más eficiente para el combate de la enfermedad.

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).

### **2.3.3 Resistencia de *P. fijiensis* a QoI's**

Las estrobilurinas al ser de acción sitio específico, han sido catalogados por el FRAC como de alto riesgo de generar resistencia, asimismo, se caracterizan por presentar resistencia cruzada, por lo que el desarrollo de resistencia a cualquiera de ellos afectaría a todos los miembros del grupo (Pérez 2006). En Costa Rica, el primer fungicida del grupo de las estrobilurinas que se utilizó comercialmente en banano para el combate de la Sigatoka negra fue el azoxystrobin (Bankit® 25 SC) a mediados del año 1997. Posteriormente, en el año 2000, ingresó el trifloxistrobin (Tega® 7.5 CE). Finalmente, en el año 2002, se liberó al mercado el pyraclostrobin (Regnum® 25 EC). Al ser moléculas nuevas, la recomendación inicial emitida por el FRAC fue de ocho ciclos al año. Sin embargo, debido al modo de acción específico de estos fungicidas, para el mes de abril del 2000 se dieron los primeros informes de cambios de sensibilidad a este grupo químico, poco tiempo después, en agosto de 2000, se reconoció la existencia de aislamientos de *P. fijiensis* resistentes a estrobilurinas en Costa Rica (FRAC 2018). Entre 2001 y 2003 la resistencia a estrobilurinas se distribuyó en todas las zonas de producción del país, disminuyendo la recomendación a tres ciclos de aplicación al año. La enfermedad se ha adaptado a las diversas condiciones ambientales y con el tiempo el patógeno se ha vuelto más agresivo, lo cual dificulta su manejo. A pesar de que la resistencia del patógeno está ampliamente distribuida por el país y debido al déficit de nuevas moléculas efectivas para el combate de la enfermedad, las estrobilurinas siguen siendo un grupo ampliamente utilizado a nivel mundial para el combate la Sigatoka negra (Chin *et al.* 2001, Sierotzki *et al.* 2000a, Guzmán *et al.* 2013).

La rápida aparición de resistencia a las estrobilurinas en diferentes hongos patógenos apunta a que el principal mecanismo por el que los hongos desarrollan resistencia es la existencia de mutaciones puntuales que ocurren en forma natural o inducida como resultado de una alta presión de selección ejercida por la molécula química en los genes que codifican para la proteína diana del fungicida, que en este caso es el *cyt b*, sin embargo hasta el momento no han sido evaluados con profundidad otros posibles mecanismos como la activación de rutas metabólicas alternas, transportadores de tipo ABC, inactivación de enzimas, variaciones en la expresión génica, entre otros (Selim 2009, Scnabel y Jones 2000, Fisher *et al.* 2004 Reiman y Deising 2005). En literatura se han descrito principalmente tres sustituciones como las responsables de generar resistencia a las estrobilurinas, conferidas por un polimorfismo de nucleótido simple (SNP: single nucleotide polymorphism). En la mayoría de los casos, la resistencia se ha descrito debido a la mutación G143A, en la cual la glicina es reemplazada por una alanina, en la posición del aminoácido 143 y confiere una resistencia total (Sierotzki *et al.* 2000a, Sierotzki *et al.* 2000b). No obstante, también se han reportado la sustitución de fenilalanina por leucina en la posición 129 (F129L) y la sustitución de una glicina por una arginina en la posición 137 (G137R) que se ha asociado con pérdidas de sensibilidad más leves en diferentes hongos fitopatógenos, sin embargo estas dos últimas mutaciones no han sido confirmadas en *P. fijiensis* (Pérez 2006, Fernández *et al.* 2008). La resistencia a las estrobilurinas también puede estar mediada por la inducción de una respiración alternativa, en la que está implicada la enzima oxidasa alternativa (AOX) que provoca una desviación en la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo succinato-deshidrogenasa (complejo II) (Fernández *et al.* 2008).

#### **2.4 PCR Tiempo Real (RT PCR)**

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT PCR, polymerase chain reaction por sus siglas en inglés) es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (Tamay de Dios *et al.* 2013). La PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en la década de los 80, que permite detectar ADN a partir de pequeñas cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces (Mullis 1990). Específicamente, fue desarrollada por Higuchi y colaboradores en 1992 y consiste en capturar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN de doble cadena durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz ultravioleta (UV) (Higuchi *et al.* 1992). Desde entonces, el objetivo de la técnica ha sido detectar y cuantificar secuencias específicas de ácidos nucleicos por medio de

reporteros fluorescentes en la reacción (Heid *et al.* 1996, Livak *et al.* 2001, Muller *et al.* 2002, Tamay de Dios *et al.* 2013).

Esta técnica combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10<sup>7</sup> equivalentes genómicos de la secuencia blanco) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior (Wang *et al.* 1989, Brechtbuehl *et al.* 2001).

Mediante la RT PCR el producto amplificado puede detectarse a tiempo real dado que la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADNc producida en cada ciclo. Para ello son componentes imprescindibles los elementos de excitación (láser, diodos o lámparas halógenas), elementos ópticos de detección integrados al termociclador y marcadores fluorescentes, que pueden ser de dos tipos: 1) Marcadores específicos que utilizan sondas de ácidos nucleicos marcadas con moléculas fluorescentes que se unen a productos amplificados específicos y emiten señales luminosas que se miden en el termociclador a medida que se obtiene el producto de la PCR. Éstos métodos son muy precisos, aunque requieren de un diseño de secuencias específicas para su uso como sondas y por consiguiente es más laborioso y costoso; y 2) Marcadores genéricos que son moléculas fluorescentes que se unen inespecíficamente al ADN de doble cadena emitiendo una señal fluorescente que se procesa a tiempo real, de modo que un aumento en el producto de PCR supone un aumento de fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR. Estos marcadores son muy utilizados por su bajo costo y porque no requieren de un diseño experimental previo (Ririe *et al.*, 1997, Muller *et al.* 2002, Tamay de Dios *et al.* 2013).

Los valores acumulados en la generación de fragmentos quedan registrados formando una curva de fluorescencia que sigue una ecuación logística similar a la que describe el crecimiento bacteriano (Wang *et al.* 1989). En ésta curva el investigador fija un punto por encima de la línea base que se denomina umbral del ciclo. Los valores umbral del ciclo (Ct value) se determinan identificando el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente atraviesa el punto umbral, por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción (Livak *et al.* 2001, Pfaffl 2001, Muller *et al.* 2002, Pfaffl *et al.* 2004).

En la PCR en tiempo real existen dos tipos de cuantificación, la absoluta y la relativa. En ambos tipos se utiliza el valor de Ct para determinar la cantidad del ADN o ARN. La cuantificación

absoluta se utiliza, principalmente, para determinar cargas virales, la presencia de agentes patógenos y transgénicos. Este tipo de ensayo permite determinar el número exacto de moléculas del ADN o ARN en una muestra. Para llevarla a cabo, se requiere una muestra con una cantidad exacta en ng/ $\mu$ L,  $\mu$ mol/ $\mu$ L, número de copias o equivalentes genómicos, como estándar absoluto externo. Este estándar puede ser un fragmento del ADN de doble cadena o de cadena sencilla, un ADNc, un producto amplificado por la PCR de la secuencia del ADN de interés clonado en un plásmido, un producto de la PCR convencional o la síntesis directa de la secuencia del ADN blanco. Este estándar externo se usa para hacer diluciones seriadas y generar una curva, a partir de los valores de Ct obtenidos para cada concentración y el logaritmo de la concentración correspondiente. Esta curva de calibración permite interpolar directamente los valores de Ct de las muestras problema y obtener su concentración (Heid *et al.* 1996, Muller *et al.* 2002, Peirson *et al.* 2003).

Por otra parte, la cuantificación relativa se utiliza, principalmente, en ensayos de expresión génica. En este caso se parte de los niveles del transcrito o ARNm de las muestras, por lo que es necesario realizar la transcripción reversa (RT) y los ensayos se conocen como RT-PCR en tiempo real. Este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés versus un gen de expresión constante que actúa como control. La diferencia con la cuantificación absoluta radica en que no se parte de una cantidad conocida del ADN, sino de un control endógeno o gen constitutivo. Debido a que no se conoce la cantidad absoluta del estándar interno, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen endógeno. Es necesario normalizar los datos entre el valor que se obtiene para el gen blanco y el del gen endógeno, de tal manera que los valores resultantes sean reflejo de los cambios de expresión del gen y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida (Livak *et al.* 2001, Liu *et al.* 2002, Huggett *et al.* 2005).

Para normalizar la expresión génica, a partir de ensayos de cuantificación relativa, existen algunos métodos y modelos que consideran la eficiencia de la amplificación para determinar la cantidad del ADN, por ejemplo el método comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak y Schmittgen 2001), el *Q gene* (Muller *et al.* 2002) y el de la curva de amplificación (Peirson *et al.* 2003); así como, los modelos de Pfaffl (Pfaffl 2001) y el modelo de Liu y Saint (Liu y Saint 2002). Entre estos el método comparativo de Ct es el más utilizado. Este método es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en ésta (número de veces) entre una

muestra experimental o gen de interés y un calibrador o gen endógeno. Se lleva a cabo un ensayo de validación usando diluciones seriadas tanto para el gen problema como para el gen endógeno. Se obtienen los valores de  $\Delta Ct$  ( $Ct_{gen} - Ct_{endógeno}$ ). Éstos se grafican en el eje y versus el logaritmo de la concentración en cada una de las diluciones en el eje x. La pendiente de la recta debe ser menor o igual a 0.1 para que el método sea válido. Este método requiere que la eficiencia de amplificación (E) sea la misma para el gen blanco y el gen endógeno, y productos de la PCR pequeños (150 pb aproximadamente) (Huggett *et al.* 2005).

La capacidad de la PCR tiempo real para detectar y cuantificar pequeñas cantidades de material genético en un amplio rango de muestras de diferentes orígenes la convierte en una herramienta excelente en técnicas de diagnóstico y de investigación, siendo en ésta última muy útil para amplificar y cuantificar moléculas de ADNc específicas obteniendo datos precisos y fiables sobre la expresión genética de las células en estudio para el diagnóstico molecular, las ciencias de la vida, agricultura y medicina (Heid *et al.* 1996, Bustin 2000, Tamay de Dios *et al.* 2013).

## 3 METODOLOGÍA

### 3.1 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología y Biología Molecular de la Dirección de Investigaciones de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), ubicados en La Rita, cantón de Pococí, provincia de Limón.

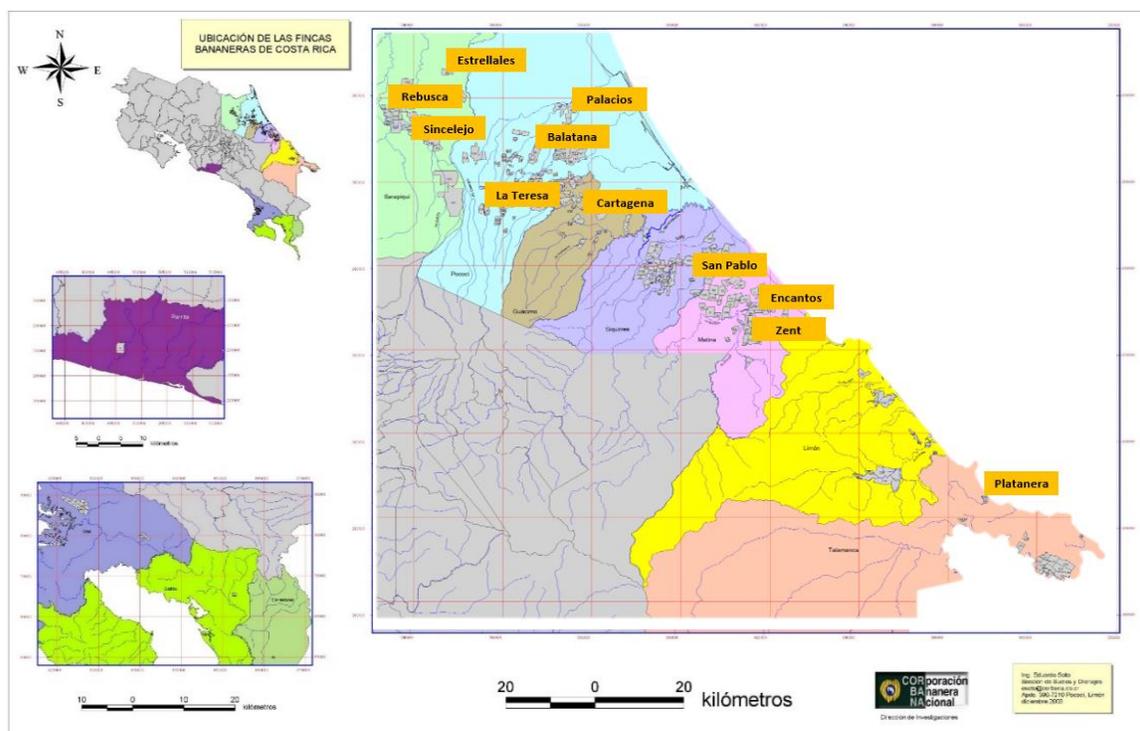
### 3.2 Etapa I. Obtención de los aislamientos de *P. fijiensis*

En esta etapa se obtuvieron los aislamientos de *P. fijiensis* que fueron evaluados durante la investigación.

#### 3.2.1 Colecta de muestras

La colecta de las muestras se realizó en doce plantaciones de banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) del Caribe y Zona Norte de Costa Rica: 11 fincas comerciales (ubicadas a lo largo del área de producción bananera de la provincia de Limón), con distinto historial de aplicación de estrobilurinas, con el objetivo de obtener aislamientos con diferente sensibilidad a esta familia de fungicidas; y una plantación testigo (ubicada en San Carlos, provincia de Alajuela, fuera del área de producción bananera), que nunca ha sido aplicada con fungicidas, con el objetivo de incluir aislamientos de finca testigo (aislamiento de referencia o línea base) (Figura 4, Anexo 1).

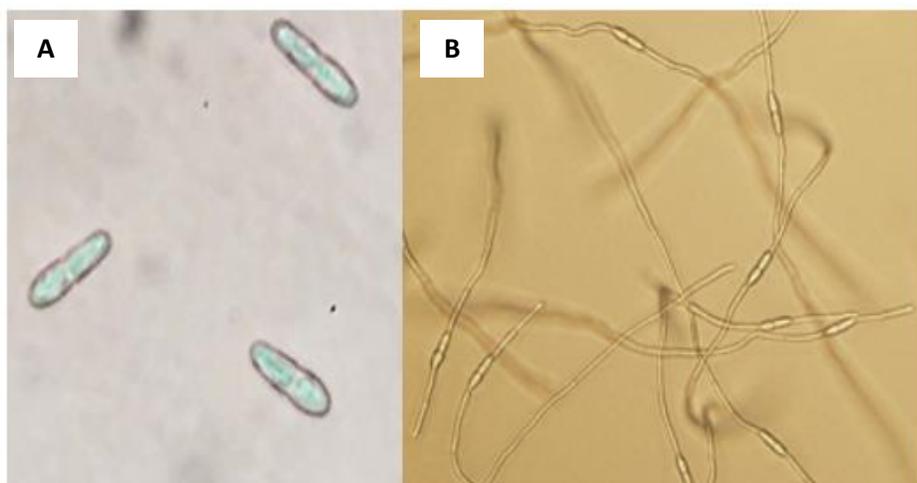
En cada plantación se muestrearon diferentes puntos siguiendo la metodología propuesta por CORBANA para el servicio de análisis de resistencia con muestreo (mínimo 5 plantas/40-50 ha). De cada punto de muestreo, se tomó tejido foliar con lesiones en estado 6 de la enfermedad según la escala de Fouré (1985) (Figura 2). Una vez colectado el material, las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Fitopatología (CORBANA) en bolsas de papel y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas.



**Figura 4.** Área en producción bananera de Costa Rica y ubicación de las fincas muestreadas. Fuente: CORBANA (2018).

### 3.2.2 Descarga de ascosporas

Se siguió la metodología utilizada por CORBANA para obtener descargas abundantes de ascosporas de *P. fijiensis* de lesiones maduras de Sigatoka negra. La misma consistió en seleccionar y cortar, con un sacabocados, discos de hoja de 20 mm de diámetro, con lesiones de la enfermedad que posean una alta densidad de pseudotecios del hongo. Se graparon cuatro discos a hojas de papel bond, se sumergieron durante ocho minutos en agua desionizada para la hidratación de los pseudotecios, luego se les eliminó el exceso de agua con una toalla absorbente y finalmente, se colocaron en las tapas de placas de Petri para que las ascosporas descargadas se depositaran sobre el fondo de la placa que contenía medio agar-agua al 3 %. El tiempo de descarga de ascosporas fue de 40 minutos y una vez cumplido este período los platos fueron incubados a 27 °C en oscuridad, por 24 horas. Transcurrido el período de incubación las placas fueron examinadas al microscopio (Olympus CH2 - 10X) para garantizar la presencia de ascosporas germinadas del patógeno mediante la emisión de dos tubos germinativos provenientes de cada célula (Figura 5).



**Figura 5.** Ascoporas de *P. fijiensis*. A) Sin germinar (Aumento 10 X) y B) Germinadas (Aumento 4X). Nótese la emisión de los tubos germinativos de cada célula de la ascospora.

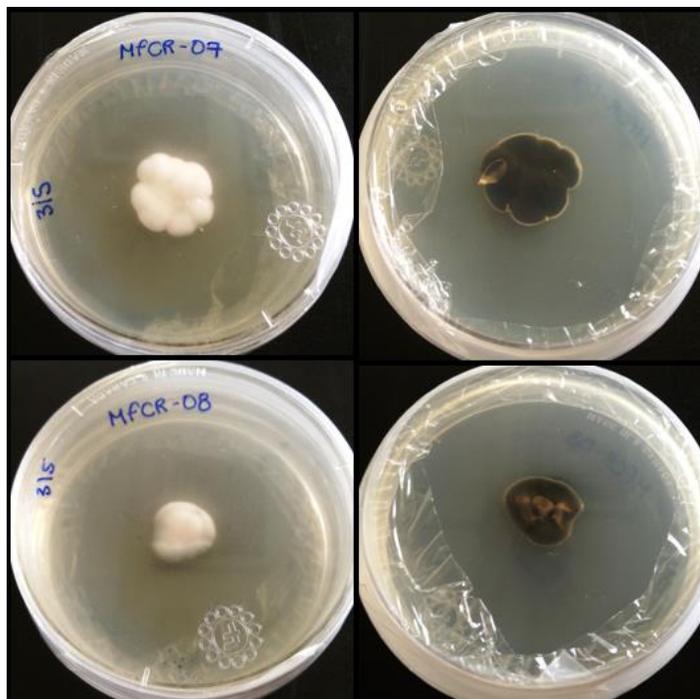
### 3.2.3 Obtención de cultivos monoascospóricos

Para la obtención de cultivos monoascospóricos se siguió la metodología empleada por CORBANA. Para esto, una vez realizada la descarga de ascoporas y transcurrido el periodo de incubación, se procedió a subcultivar, en condiciones asépticas, una ascospora germinada de *P. fijiensis* en placas con Agar Papa Dextrosa (PDA) (Cuadro 3) con ayuda de un estereoscopio y una aguja de disección. Las placas fueron selladas y colocadas dentro de una incubadora por 10 días, en oscuridad, a 27 °C. En total se trabajó con 5 aislamientos monoascospóricos de cada finca comercial y 10 aislamientos monoascospóricos de la plantación testigo, para un total de 65 aislamientos del patógeno (Figura 6).

**Cuadro 3.** Composición del medio Agar Papa Dextrosa (PDA).

Reactivo	Cantidad (g/L)
Infusión de papa	4,0
Dextrosa	20,0
Agar	15,0

\*pH = 5,6.



**Figura 6.** Vista superior e inferior del crecimiento típico de dos cultivos monoascospóricos de *P. fijiensis* con 10 días de crecimiento en medio PDA a 27 °C y en oscuridad.

### 3.2.4 Conservación de los aislamientos

La conservación de los aislamientos de *P. fijiensis* se realizó siguiendo la metodología propuesta por CORBANA (Fito-PRT-011). Para esto, en viales de vidrio de 25 ml se dispensaron 10 ml de PDA y se dejó reposar con una inclinación aproximada de 30° hasta la solidificación del medio. Posteriormente, se sembró en la superficie partes de micelio obtenido de los cultivos monoascospóricos y se incubaron por 10 días a 27 °C en oscuridad hasta que los aislamientos alcanzaron un buen desarrollo. Seguidamente, a cada uno de los viales se les adicionó aceite mineral estéril hasta cubrir por completo los cultivos y se sellaron asépticamente. De cada uno de los aislamientos se prepararon dos viales y se mantienen a 10 °C en oscuridad.

### 3.3 Etapa II. Determinación de la sensibilidad *in vitro* de *P. fijiensis* a las estrobilurinas

Con el fin de clasificar cada aislamiento de acuerdo a su nivel de sensibilidad *in vitro* a las estrobilurinas se utilizó el azoxystrobin (Bankit® 25 EC) y pyraclostrobin (Regnum® 25 EC) como ingredientes activos representantes de este grupo de fungicidas, esto por ser los más empleados

en la actualidad a nivel nacional para el combate de la Sigatoka negra. Para esto, cada aislamiento fue expuesto a diferentes concentraciones de cada fungicida.

### 3.3.1 Evaluación de la sensibilidad *in vitro* a los fungicidas azoxystrobin y pyraclostrobin (Crecimiento micelial en medio sólido)

Los cultivos se realizaron a partir de una suspensión de conidios en platos de Petri con medio PDA suplementado con 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100,0 mg/L de azoxystrobin y pyraclostrobin. Para esto, cada uno de los aislamientos de *P. fijiensis* se reactivaron en PDA durante 8 días en oscuridad a 26 °C. Seguidamente, para estimular la producción de conidios, se preparó una suspensión de partes de micelio, la cual se inoculó en medio de jugo de vegetales V8® (Cuadro 4) y se incubó a 27 °C con luz continua por 10 días. Posteriormente, se prepararon los medios de cultivo con las diferentes concentraciones de azoxystrobin y pyraclostrobin, se vertieron en placas de Petri de 60 x 15 mm (aproximadamente 10 ml de medio por placa) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta que solidificaron. Finalmente, los medios se inocularon con 50 µl de una suspensión de 20.000 conidios y partes de micelio/ml de cada aislamiento, preparado en agua desionizada estéril más Tween® 20 al 0,05 %. Las placas de Petri se incubaron en oscuridad durante 5 días a 26 °C ± 2 °C. Cada concentración de fungicida contó con 3 repeticiones.

**Cuadro 4.** Composición del medio de jugo de vegetales V8®.

Reactivo	Cantidad (g o ml/L)
Carbonato de Calcio (CaCO <sub>3</sub> )	0,2
Jugo de vegetales V8® (tomate, zanahoria, apio, limón y culantro)	100,0
Agar	20,0

\*pH: 6,0.

### 3.3.2 Diseño experimental y análisis de datos

Transcurrido el período de incubación, se realizó la medición del diámetro de 50 colonias con ayuda de un micrómetro ocular para microscopio (Olympus BX51). Una vez realizadas las mediciones se procedió a calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial para las diferentes concentraciones (% INH) para cada tratamiento (T), el cual se calculó considerando el

crecimiento del hongo del control absoluto (C. abs) como 100 % y utilizando la fórmula: % INH= [(promedio C.abs – promedio T) / promedio C.abs]\*100. Asimismo, mediante un análisis de regresión lineal del logaritmo natural entre las concentraciones utilizadas y los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial se determinó la Concentración Efectiva Media (CE<sub>50</sub>) de cada una de los aislamientos del patógeno. Según el valor de EC<sub>50</sub>, los aislamientos se clasificaron en cinco niveles de resistencia: silvestres ( $\leq 0,001$  mg/L), sensibles ( $> 0,001-1$  mg/L), moderadamente sensible ( $> 1-10$  mg/L), resistente ( $> 10-100$  mg/L) y muy resistente ( $> 100$  mg/L).

### **3.4 Etapa III. Análisis molecular de la sensibilidad de *P. fijiensis* a las estrobilurinas**

Una vez clasificados los 65 aislamientos según su sensibilidad *in vitro* a los fungicidas, se procedió a confirmar la presencia y/o ausencia de las mutaciones G143A, F129L y G137R asociadas con la resistencia a las estrobilurinas. Asimismo, se seleccionaron 10 aislamientos de *P. fijiensis*: 8 resistentes (Rebusca 3, Encantos 10, San Pablo 2, Estrellales 3, Encantos 5, Sincelejo 2, La Teresa 1 y Platanera 3) y 2 silvestres (ZTSC 27 y ZTSC 30) para cuantificar la expresión relativa del gen *cyt b*.

#### **3.4.1 Confirmación molecular de las mutaciones G143A, F129L y G137R**

##### **3.4.1.1 Extracción de ADN**

Para todos los aislamientos, se realizó la extracción de ADN con fenol cloroformo siguiendo la metodología descrita por Brandfass y Karlovsky (2008) modificada por CORBANA. Una vez realizada la extracción, la concentración y pureza del ADN se estimó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific). De igual manera, la integridad del ADN se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con GelRed™ en TBE 1X, durante 60 minutos a 90 voltios. Finalmente, los productos de la extracción se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta UVIDOC HD5 (UVITEC, Cambridge).

##### **3.4.1.2 Amplificación por PCR del gen *cyt b***

El ADN extraído se utilizó como molde para amplificar una región del gen *cyt b* de *P. fijiensis*. Para esto se emplearon los iniciadores MFcyFor (5'-CTCAATACTGCCTCAGC-3') y MFcyRev (5'-CCGTAATGTGGTTCATC-3') utilizados por García (2009), los cuales amplifican un fragmento de

285 pb que incluye las mutaciones G143A, F129L y G137R. Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl compuesta por 50 ng de ADN, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 600 µM de dNTP's, 5 µM de cada primer y 0,4 U de Taq-DNA. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo inicial de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, concluyendo con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystem). Posteriormente, los productos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con GelRed™ en TBE 1X, durante 45 minutos a 83 voltios. Como marcador molecular se empleó el Gene Ruler 100 pb Plus DNA Ladder-ready to use (Fermentas). Finalmente, los productos fueron visualizados y fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta UVIDOC HD5 (UVITEC, Cambridge).

#### **3.4.1.3 Secuenciación parcial del gen *cyt b***

Una vez amplificado el gen *cyt b* y con colaboración de la Corporación para Investigaciones Biológicas (Medellín - Colombia), se procedió a enviar las muestras a secuenciar con la empresa MAGROGEN (Corea del Sur). La información generada fue proporcionada en forma de electroferogramas que se visualizaron y editaron con el programa informático Bioedit 7,1. Posteriormente, las secuencias fueron procesadas y ensambladas en el programa Geneious v.7,1 y se alinearon mediante mapeo a referencia con la secuencia reportada en el Genbank (AF343070.1) (Sierotzki *et al.* 2000a). El cambio de una guanina (GGA) por una citosina (GCA) en el nucleótido 381 reveló la presencia o ausencia de la mutación G143A. Asimismo, la sustitución de una timina (TTT) por una citosina (CTT) en el nucleótido 337 permitió determinar la presencia o ausencia de la mutación F129L. Por otra parte, el reemplazo de una guanina (GGT) por una citosina (CGT) en el nucleótido detectó la presencia o ausencia de la mutación G137R.

#### **3.4.2 Cuantificación relativa de la expresión del gen *cyt b***

Para la cuantificación de la expresión génica se utilizó el crecimiento micelial de diez aislamientos de *P. fijiensis*: dos silvestres (ZTSC 27 y ZTSC 30) y ocho resistentes (Rebusca 3, Encantos 10, San Pablo 2, Estrellales 3, Encantos 5, Sincelejo 2, La Teresa1 y Platanera 3) seleccionados según los resultados *in vitro* y la secuenciación parcial del gen *cyt b*.

### 3.4.2.1 Extracción de ARN

Para la extracción del ARN se siguió el protocolo propuesto por Islas *et al.* (2006), en el cual se parte de crecimiento micelial del patógeno en medio líquido para garantizar la obtención de ARN de *P. fijiensis* libre de melanina y de alta calidad. La metodología consistió en tomar 250 mg del crecimiento fúngico previamente macerado con nitrógeno líquido en un mortero, los cuales fueron homogeneizados con 1 ml de Trizol (Invitrogen), y se incubaron por 5 minutos a 25 °C. Posteriormente, se agregaron 0,2 ml de cloroformo, se agitó manualmente por 15 segundos y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, la muestra se centrifugó por 15 minutos a 13.000 rpm. El ARN, presente en la fase acuosa (sobrenadante), se recolectó y se colocó en un tubo nuevo al cual se le incorporaron 0,5 volúmenes de etanol absoluto. Los ARN's precipitados se transfirieron a una columna de centrifugación RNeasy spin (rosa) (Qiagen) y se centrifugaron a 10.000 rpm por 15 segundos. Consecuentemente, la columna se lavó primero con 700 µl del buffer RW1 y segundo con 500 µl del buffer RPE mediante centrifugación a 10.000 rpm por 2 minutos, respectivamente, y se realizó una tercera centrifugación a 8.000 rpm por 15 segundos para eliminar posible buffer remanente. Finalmente, la columna se transfirió, cuidadosamente, a otro tubo de recolección y se le realizó un tercer lavado, por duplicado, con 30 µl agua libre de RNasa a 8.000 rpm por 1 minuto, con el objetivo de eluir el ARN.

Una vez extraído el ARN, se procedió a tratar las muestras con DNasa utilizando el kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific), para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante. Cada reacción se realizó a partir de 1 µg de ARN, 1 µl de Buffer 10 X, DNase, 1 U RNase free y agua DEPC hasta completar 10 µl. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 37 °C por 30 minutos. Seguidamente, se adicionó 1 µl de EDTA (50 mM) y se incubó a 65 °C por 10 minutos.

Finalmente, la concentración y pureza del ARN obtenido fue determinado mediante el espectrofotómetro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific). De la misma manera, el producto se visualizó por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa al 1,2 % con formaldehído al 37 % teñido con GelRed™, durante 45 minutos a 83 voltios. Finalmente, los productos fueron visualizados y fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta UVIDOC HD5 (UVITEC, Cambridge).

### 3.4.2.2 Síntesis de ADNc y PCR tiempo real cuantitativo (q-RT-PCR)

Una vez obtenido el ARN se procedió a sintetizar el ADN complementario y a realizar la cuantificación relativa del gen *cyt b* de los aislamientos de *P. fijiensis* utilizando el kit Power SYBR™ Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Applied Biosystems), para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante. Cada reacción se realizó a partir de 5 µl de Power SYBR® Green RT-PCR Mix (2X), 1 µl de cada iniciador a 1 µM, 0,08 µl de RT Enzyme Mix (125 X) y 2 µl de ARN a 50 ng/µl, para un volumen total de 10 µl. El PCR cuantitativo se realizó utilizando el gen de la actina como control endógeno en un equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Se incluyó un control negativo (sin ARN) así como un control sin la enzima retrotranscriptasa para descartar contaminación con ADN en las muestras. Las condiciones para la retrotranscripción fueron 30 minutos a 48 °C seguido por 10 minutos a 95 °C. Posteriormente, las condiciones de amplificación fueron un ciclo inicial de 94 °C durante 15 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, concluyendo con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Finalmente, las condiciones para la curva de melt fueron 15 segundos a 94 °C, 15 segundos a 60 °C y 15 segundos a 94 °C. En el cuadro 5 se detallan los iniciadores utilizados en las reacciones de q-RT-PCR y el tamaño del producto que amplifican.

**Cuadro 5.** Secuencias nucleotídicas de los iniciadores utilizados en la q-RT-PCR y el tamaño de los fragmentos amplificados.

Blanco	Iniciadores	Secuencia	Amplicón	Referencia
<i>cyt b</i>	MF01_for	5'-GGGTATGTTTTACCTTATGGTC-3'	77 pb	Ngando <i>et al.</i> (2013)
	MF02_rev_bio	5'-AGGGTATAGCGCTCATT-3'		
Actina	<i>QRTACT-forward</i>	5'-TCCGTCCTTGGTCTCGAATCTGGT-3'	146 pb	Chong (2016)
	<i>QRTACT-reverse</i>	5'-TGCATACGGTCCGAGATACCTGGA-3'		

### 3.4.2.3 Análisis de la expresión relativa del gen *cyt b*

Para el análisis de la expresión del gen *cyt b* se utilizó el método de  $\Delta\Delta Ct$  con los valores de Ct se aplicó la fórmula de cálculo de expresión génica para la cual se calcula la media del Ct y a ésta se le restó la media del Ct del gen endógeno. De esta forma se obtuvo el dato del  $\Delta Ct$ . A su vez, a este valor, se le restó el  $\Delta Ct$  de la muestra que se toma como referencia de expresión normal,

aquella que no presentó las mutaciones y no ha sido expuesta al fungicida. El apunte final se conoce como  $\Delta\Delta Ct$  y a su valor negativo en potencia de base 2, RQ (Livak y Schmittgen 2001).

Con base en lo anterior, los datos obtenidos de ciclo umbral o *cycle threshold* (Ct) fueron normalizados por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Una vez calculados los valores de expresión génica relativa, se realizó una corrección logarítmica para minimizar la varianza de los valores, por la naturaleza exponencial de la curva de PCR en tiempo real. En total se realizaron 10 repeticiones biológicas con tres repeticiones técnicas cada uno.

### **3.5 Etapa IV. Evaluación en invernadero de la patogenicidad y virulencia de aislamientos de *P. fijiensis* con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas**

Con base a los resultados obtenidos en las etapas II y III se procedió a evaluar en invernadero la patogenicidad y virulencia de diez aislamientos de *P. fijiensis* con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas utilizando plantas jóvenes de banano (con aproximadamente 20 semanas de edad) y una inoculación controlada del patógeno.

#### **3.5.1 Material experimental**

Plantas del cultivar Grande Naine (*Musa* AAA) obtenidas por cultivo *in vitro* de ápices, fueron trasplantadas a bandejas plásticas para completar su desarrollo en vivero por un período de siete semanas. Posteriormente, las plantas fueron sembradas en potes de 2 L y se trasladaron al invernadero para su aclimatación por 9 semanas a una temperatura de 24 °C, humedad al 60 % y un fotoperiodo natural (12 horas luz – 12 horas oscuridad). Durante la aclimatación, las plantas recibieron un programa de fertilización recomendado por la sección de Relación Suelo-Planta de CORBANA (Anexo 4). Además, se eliminó por medio de deshoja cualquier lesión de Sigatoka negra que arrastraron éstas del vivero.

#### **3.5.2 Tratamientos**

De la etapa II y III se procedió a seleccionar diez aislamientos con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas, 5 silvestres (G143) y 5 resistentes (G143A). Estos se multiplicaron *in vitro* en medio de jugo de vegetales V8® para estimular la producción de conidios y partes de micelio siguiendo la metodología detallada en la sección 3.3.1. Una vez concluido el periodo de

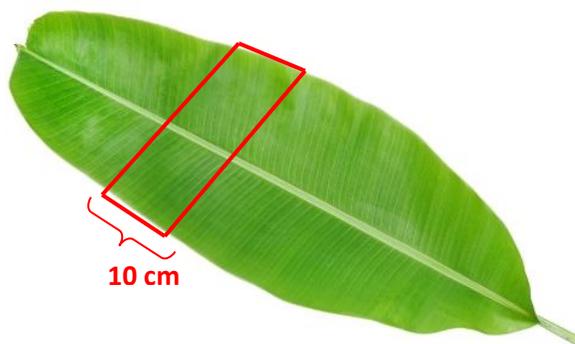
incubación, de cada aislamiento se preparó una suspensión en agua más Tween® 20 (0,05 %) (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Detalle de los aislamientos de *P. fijiensis*, con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas, evaluados en invernadero.

Tratamiento	Aislamiento	EC <sub>50</sub>		Genotipo
		Azoxystrobin	Pyraclostrobin	
1	ZTSC 11	0,010	< 0,001	G143
2	ZTSC 5	0,022	< 0,001	G143
3	ZTSC 6	< 0,001	< 0,001	G143
4	ZTSC 12	< 0,001	< 0,001	G143
5	Zent 2.3	< 0,001	< 0,001	G143
6	Encantos 10	> 100,000	0,040	G143A
7	San Pablo 2	> 100,000	1,320	G143A
8	Estrellales 3	> 100,000	12,180	G143A
9	Rebusca 2	> 100,000	40,440	G143A
10	Platanera 3	> 100,000	> 100,000	G143A

### 3.5.3 Inoculación de los tratamientos

Una vez que las plantas emitieron 5 hojas en el invernadero (aproximadamente 30 cm de altura) se marcó en el envés de la hoja 1 un rectángulo de 10 cm de ancho, por encima de la mitad de la hoja hacia el ápice de la misma, sobre el cual se inocularon los aislamientos de *P. fijiensis* (Figura 7). En total se inocularon, por el envés, 6 ml de cada suspensión por unidad experimental, para esto se utilizó una bomba de aspersión manual buscando una cobertura total del área demarcada. Las plantas se mantuvieron dentro del invernadero con condiciones de lluvia simulada (>90 % humedad) y temperatura controlada (27 °C ± 2 °C) óptimas para la infección del hongo.



**Figura 7.** Metodología de inoculación de los aislamientos de *P. fijiensis*.

### **3.5.4 Manejo de las plantas después de la inoculación**

Para promover la infección del hongo, durante los primeros días después de la inoculación del patógeno el riego en el invernadero se realizó por espacio de un minuto cada hora (6:00 a.m a 6:00 p.m) hasta la aparición de los primeros síntomas. Cuando esto ocurrió, el riego se cambió a un minuto cada tres horas de 6:00 a.m a 6:00 p.m. El riego fue programado y controlado con un equipo automático Rain bird controller, modelo MIC-4, HO.

### **3.5.5 Diseño experimental y análisis de los datos**

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar con 6 repeticiones de cada uno, cada hoja representó una unidad experimental. Las plantas fueron inspeccionadas semanalmente para determinar el momento de la aparición de los primeros síntomas. Para cada aislamiento se evaluaron las variables: periodo de incubación (PI), definido como el tiempo (días) desde el momento de la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas; periodo de evolución de los síntomas (PES), registrado como el tiempo (días) desde la aparición de los primeros síntomas hasta el estado de mancha con centro necrosado; periodo infeccioso (PIF) el cual corresponde al tiempo (días) desde la inoculación hasta la aparición de la mancha con centro seco y la severidad de la enfermedad que corresponde al porcentaje de área foliar afectada por el patógeno. Para cada una de las variables se realizó un análisis de varianza con comparación de todos los aislamientos entre sí y un contraste entre los promedios de los aislamientos sensibles (G143) y los aislamientos resistentes (G143A). Todos los datos fueron procesados mediante el programa estadístico R, para lo cual se utilizó los paquetes “Base” y “Car” para hacer el análisis de varianza y “emmeans” para comparaciones múltiples y contrastes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Etapa I. Obtención de los aislamientos de *P. fijiensis*

En total se lograron obtener 65 aislamientos monoascospóricos de *P. fijiensis* provenientes de 11 fincas comerciales ubicadas a lo largo del área de producción bananera de la provincia de Limón (Balatana, Cartagena, Encantos, Estrellales, La Teresa, Palacios, Platanera, Rebusca, San Pablo, Sincelejo y Zent) y una plantación testigo (ZTSC). De cada finca comercial se aislaron 5 aislamientos y de la plantación testigo 10 aislamientos, esto con el objetivo de incluir aislamientos con diferente grado de resistencia al fungicida. La totalidad de los aislamientos se encuentran conservados a 10 °C por duplicado (Figura 8). En el cuadro 7 se detalla la lista de aislamientos obtenidos.

**Cuadro 7.** Lista de aislamientos monoascospóricos de *P. fijiensis* obtenidos de 10 fincas comerciales y una plantación testigo de Costa Rica.

N°	Aislamiento	N°	Aislamiento
1	Balatana 1	34	Platanera 4
2	Balatana 2	35	Platanera 5
3	Balatana 5	36	Rebusca 1
4	Balatana 3	37	Rebusca 2
5	Balatana 10	38	Rebusca 3
6	Cartagena 1	39	Rebusca 4
7	Cartagena 2	40	Rebusca 10
8	Cartagena 5	41	San Pablo 1
9	Cartagena 8	42	San Pablo 2
10	Cartagena 9	43	San Pablo 3
11	Encantos 2	44	San Pablo 4
12	Encantos 3	45	San Pablo 5
13	Encantos 4	46	Sincelejo 1
14	Encantos 5	47	Sincelejo 2
15	Encantos 10	48	Sincelejo 3
16	Estrellales 1	49	Sincelejo 4
17	Estrellales 2	50	Sincelejo 5
18	Estrellales 3	51	Zent 1.11
19	Estrellales 4	52	Zent 2.3
20	Estrellales 5	53	Zent 2.8
21	La Teresa 1	54	Zent 2.12
22	La Teresa 2	55	Zent 5.1

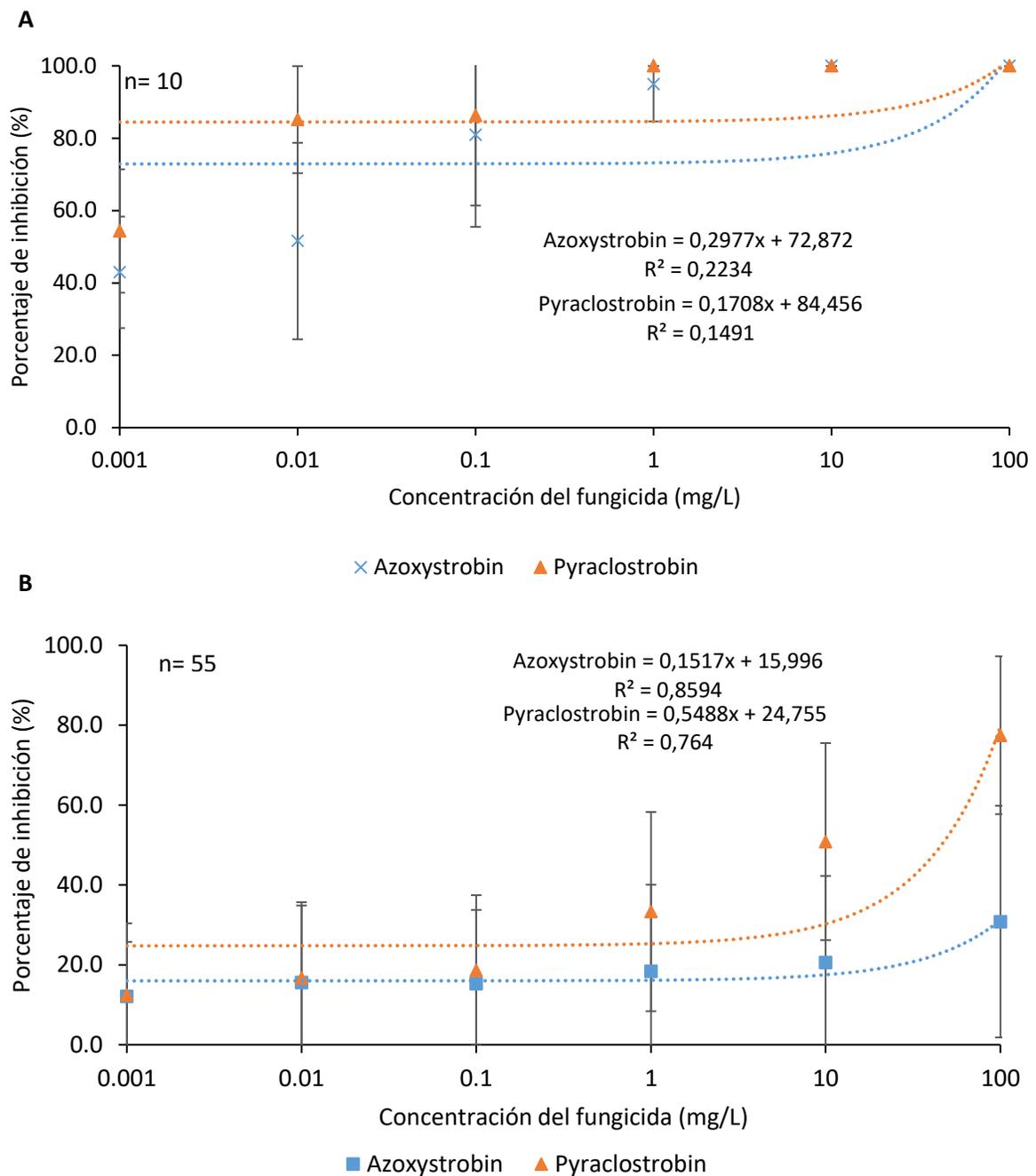
23	La Teresa 3	56	ZTSC 3
24	La Teresa 4	57	ZTSC 5
25	La Teresa 5	58	ZTSC 6
26	Palacios 1	59	ZTSC 7
27	Palacios 3	60	ZTSC 11
28	Palacios 5	61	ZTSC 12
29	Palacios 6	62	ZTSC 13
30	Palacios 13	63	ZTSC 18
31	Platanera 1	64	ZTSC 27
32	Platanera 2	65	ZTSC 30
33	Platanera 3	-	-



**Figura 8.** Metodología de conservación de aislamientos de *P. fijiensis*. (A) Vial e inclinación del medio utilizado para la siembra del hongo (PDA), (B) Crecimiento del hongo al sellar el vial con membrana millipore y (C) Cultivo listo para conservar.

#### 4.2 Etapa II. Determinación de la sensibilidad *in vitro* de *P. fijiensis* a las estrobilurinas

Los aislamientos de la población silvestre fueron altamente sensibles a los dos fungicidas evaluados, con porcentajes de inhibición superiores al 40 % a partir de la concentración de 0,001 mg/L y cercanos o iguales al 100 % a partir de 0,1 mg/L. Por el contrario, los aislamientos de las fincas comerciales evidenciaron una clara pérdida de sensibilidad a los dos fungicidas, aunque en menor grado al pyraclostrobin con respecto al azoxystrobin (Figura 9).



**Figura 9.** Sensibilidad *in vitro* de aislamientos monoascospóricos de *P. fijiensis* a pyraclostrobin y azoxystrobin de una población silvestre (A) y de 11 fincas comerciales de banano (B) en Costa Rica.

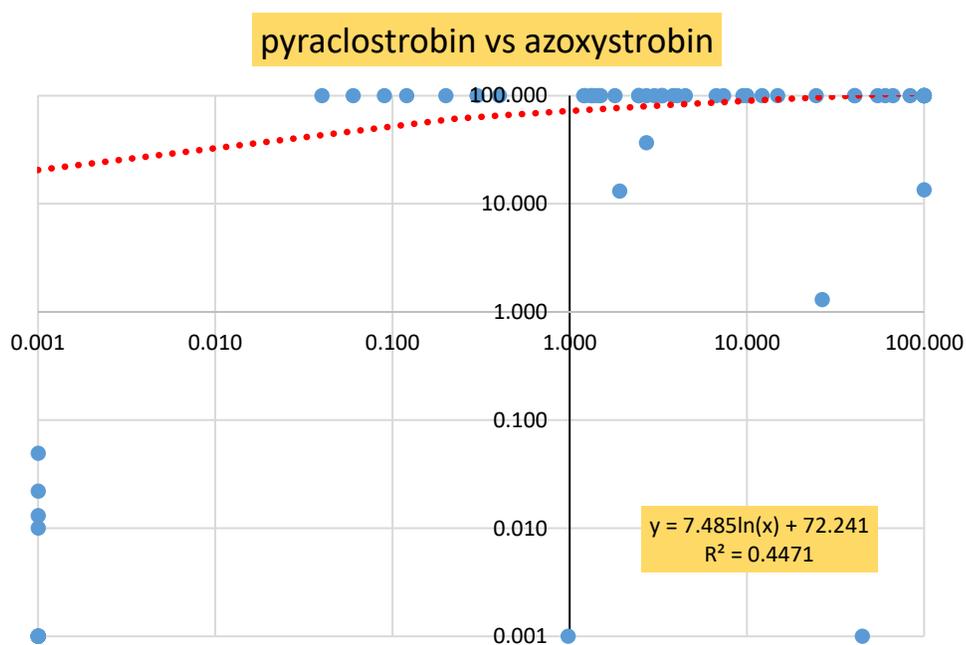
Los valores promedio de CE<sub>50</sub> reflejan la diferencia entre los aislamientos silvestres y los de fincas comerciales. Mientras que en el primer caso los valores máximos de CE<sub>50</sub> fueron ≤ 0,022, en las

fincas comerciales hubo aislamientos con  $CE_{50} > 100$ . Los factores de resistencia fueron  $> 12.000,000$  evidencia clara de la pérdida de sensibilidad a estos fungicidas en las plantaciones comerciales. Pyraclostrobin presentó el valor más bajo de  $CE_{50}$  promedio y una menor frecuencia de aislamientos con  $CE_{50} > 100$  (Cuadro 8, Anexo 2).

**Cuadro 8.** Valores de  $CE_{50}$  (mg/L) promedio, mínimos, máximos y factor de resistencia de los aislamientos monoascospóricos de *P. fijiensis* para azoxystrobin y pyraclostrobin.

	Aislamientos de fincas comerciales ( $CE_{50}$ )		Aislamientos silvestres ( $CE_{50}$ )	
	Azoxystrobin	Pyraclostrobin	Azoxystrobin	Pyraclostrobin
<b>Promedio</b>	93,057	23,222	0,007	< 0,001
<b>Min.</b>	1,300	0,040	< 0,001	< 0,001
<b>Max.</b>	> 100,000	> 100,000	0,022	< 0,001
<b>Factor de Resistencia</b>	12.747,472	23.222,417	-	-

El análisis de correlación evidenció que existe resistencia cruzada entre los dos fungicidas (pyraclostrobin vs azoxystrobin  $R^2 = 0,4471$ , figura 10). El grado de ajuste de la ecuación se vio limitado por el rango de concentraciones, ya que una considerable cantidad de aislamientos tuvieron valores de  $CE_{50}$  mayores que la dosis máxima evaluada (100 mg/L).



**Figura 10.** Análisis de correlación entre los valores de  $CE_{50}$  de los fungicidas azoxystrobin y pyraclostrobin en aislamientos monoascospóricos de *P. fijiensis*.

La totalidad de los aislamientos fueron clasificados en cinco fenotipos diferentes en función de la sensibilidad *in vitro* (CE<sub>50</sub>): silvestres ( $\leq 0,001$  mg/L), sensibles ( $>0,001-1$  mg/L), moderadamente sensibles ( $>1-10$  mg/L), resistentes ( $>10-100$  mg/L) y muy resistentes ( $>100$  mg/L). La mayoría de los aislamientos de la plantación silvestre se ubicó en el fenotipo silvestre, como era esperable; mientras que los aislamientos de plantaciones comerciales se ubicaron en fenotipos de menor sensibilidad en el rango de sensible a muy resistente. La distribución de los aislamientos fue muy diferente entre azoxystrobin y pyraclostrobin (Cuadro 9, Anexo 3). En este último fungicida se detectaron aislamientos en un rango más amplio de fenotipos, desde silvestres (3,6 %) hasta muy resistentes (16,4 %), pero con una menor frecuencia en la categoría de mayor resistencia comparado con azoxystrobin y una considerable proporción de aislamientos en la categoría moderadamente sensible (45,5 %). Con la evaluación de aislamientos monoascospóricos se corroboró la presencia de individuos resistentes a los dos fungicidas, sin embargo, la pérdida de sensibilidad fue mayor a azoxystrobin que a pyraclostrobin. Asimismo, se comprobó la existencia de resistencia cruzada entre estos.

**Cuadro 9.** Distribución de los aislamientos de *P. fijiensis* según su valor de CE<sub>50</sub> para azoxystrobin y pyraclostrobin.

Clasificación por CE <sub>50</sub>	Aislamientos de fincas comerciales		Aislamientos silvestres	
	Azoxystrobin	Pyraclostrobin	Azoxystrobin	Pyraclostrobin
Silvestre ( $\leq 0,001$ mg/L)	4	2	6	10
Sensible ( $>0,001-1$ mg/L)	0	8	4	-
Moderadamente sensible ( $>1-10$ mg/L)	1	25	-	-
Resistente ( $>10-100$ mg/L)	3	11	-	-
Muy Resistente ( $>100$ mg/L)	47	9	-	-

### 4.3 Etapa III. Análisis molecular de la sensibilidad de *P. fijiensis* a las estrobilurinas

#### 4.3.1 Confirmación molecular de las mutaciones G143A, F129L y G137R

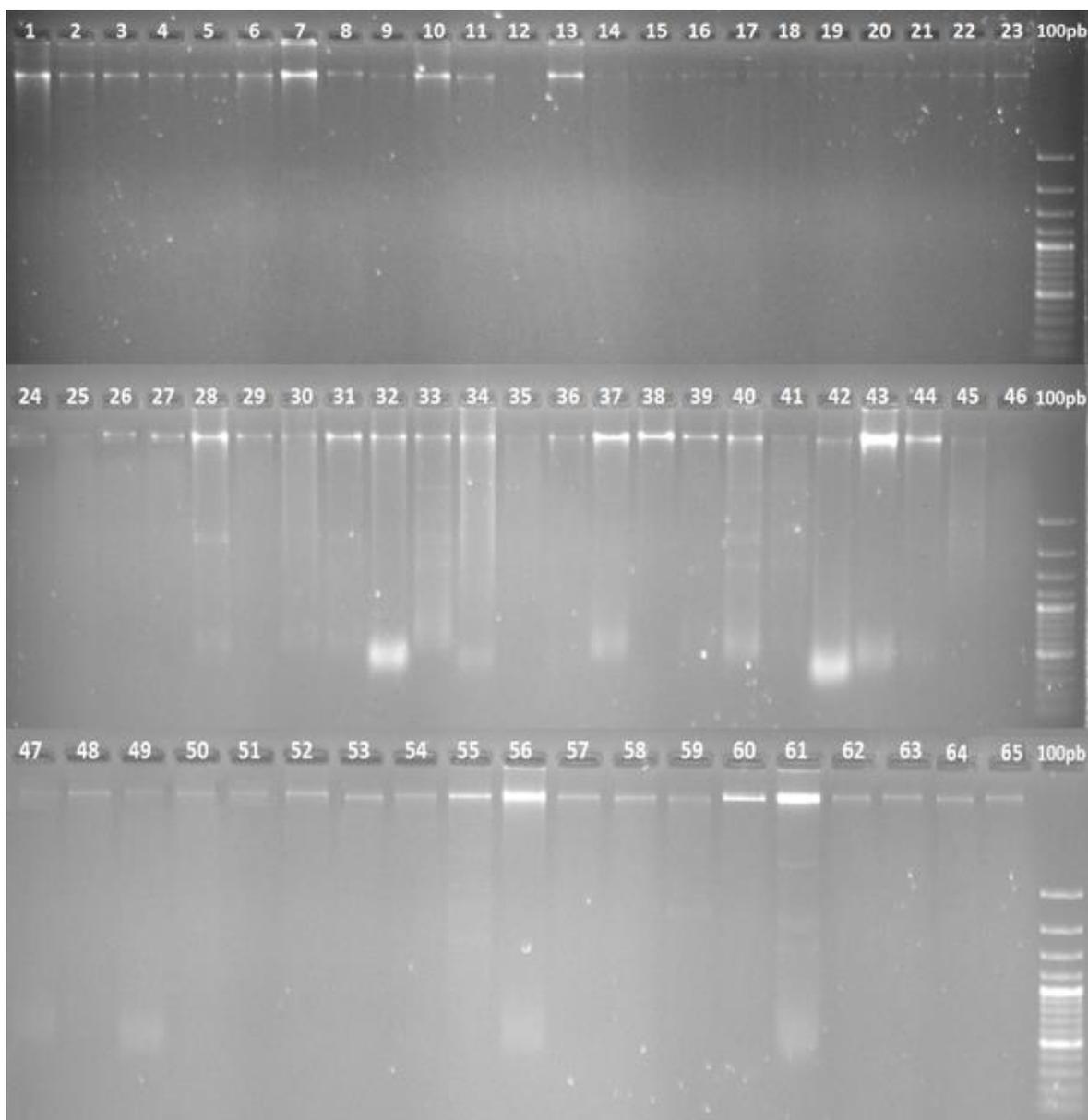
Una vez caracterizados los aislamientos de *P. fijiensis* por su sensibilidad a los fungicidas azoxystrobin y pyraclostrobin se procedió a la extracción de ADN de cada uno de estos y a la

amplificación de un fragmento del gen *cyt b*. Mediante la metodología utilizada se logró extraer el material genético de una adecuada cantidad y calidad (Cuadro 10 y figura 11).

**Cuadro 10.** Resultados de la cuantificación de ADN de los aislamientos de *P. fijiensis*.

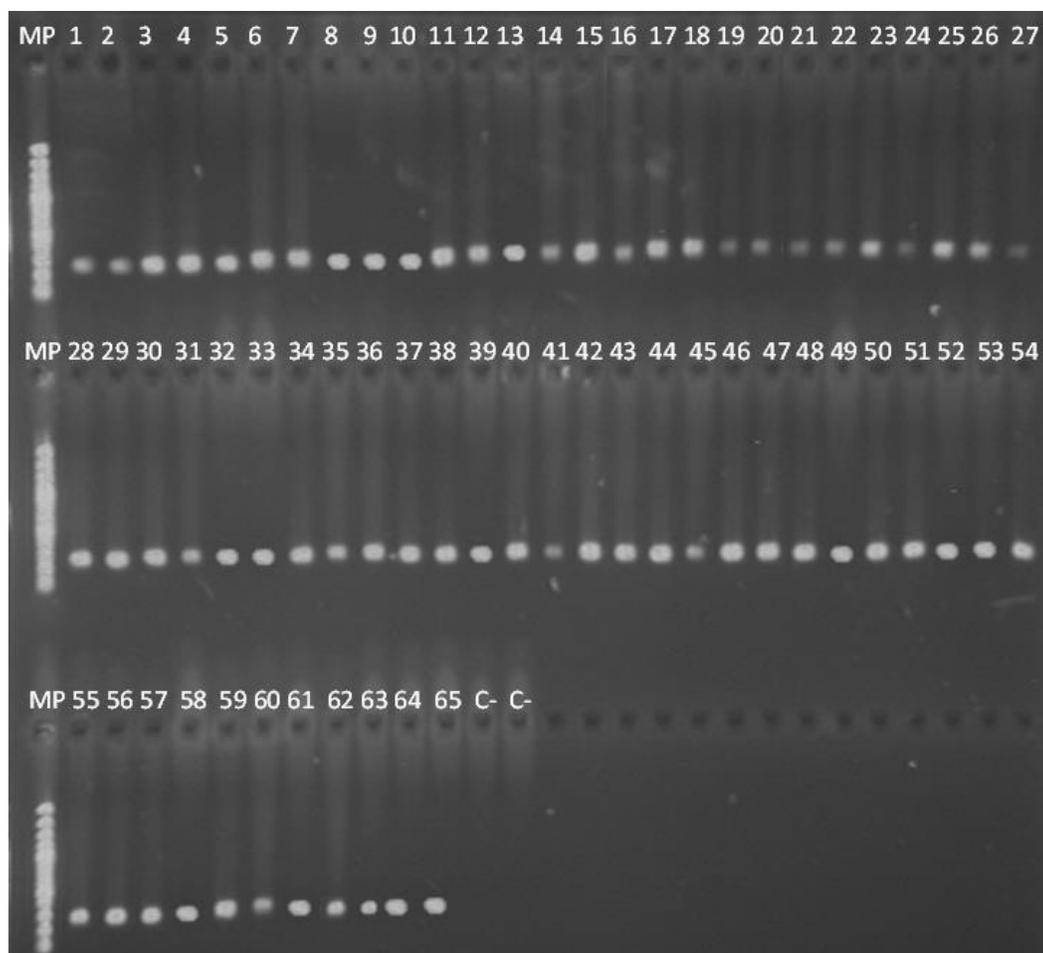
Procedencia	Código del Aislamiento	Cuantificación de ADN		
		Concentración de ADN (ng/μl)	260/280	260/230
Aislamientos de fincas comerciales	Balatana 1	99,30	1,54	1,84
	Balatana 2	123,60	1,58	1,9
	Balatana 3	105,30	1,55	1,87
	Balatana 5	170,50	1,6	1,83
	Balatana 10	104,80	1,47	1,8
	Cartagena 1	25,70	1,51	1,81
	Cartagena 2	71,00	1,46	1,77
	Cartagena 5	29,60	1,52	1,81
	Cartagena 8	60,00	1,46	1,82
	Cartagena 9	37,00	1,31	1,39
	Encantos 2	23,90	1,49	1,71
	Encantos 3	45,50	1,46	1,74
	Encantos 4	39,80	1,43	1,76
	Encantos 5	33,40	1,42	1,70
	Encantos 10	161,50	1,51	1,85
	Estrellares 1	47,20	1,39	1,66
	Estrellares 2	150,80	1,51	1,88
	Estrellares 3	106,80	1,46	1,68
	Estrellares 4	156,30	1,52	1,83
	Estrellares 5	119,00	1,47	1,81
	La Teresa 1	67,80	1,43	1,78
	La Teresa 2	38,00	1,42	1,64
	La Teresa 3	33,80	1,43	1,71
	La Teresa 4	145,30	1,5	1,83
	La Teresa 5	53,90	1,42	1,74
	Palacios 1	159,40	1,61	1,95
	Palacios 5	147,20	1,59	1,81
	Palacios 6	122,40	1,59	1,74
	Palacios 10	110,90	1,47	1,80
	Palacios 13	189,40	1,64	1,95
	Platanera 1	53,10	1,45	1,62
	Platanera 2	82,90	1,46	1,77
	Platanera 3	126,50	1,48	1,82

	Platanera 4	39,70	1,45	1,7
	Platanera 5	20,60	1,48	1,7
	Rebusca 1	33,90	1,44	1,77
	Rebusca 2	48,60	1,43	1,73
	Rebusca 3	39,70	1,42	1,72
	Rebusca 4	50,00	1,43	1,74
	Rebusca 10	65,20	1,48	1,73
	San Pablo 1	187,80	1,63	2,01
	San Pablo 2	66,20	1,41	1,67
	San Pablo 3	119,50	1,59	1,94
	San Pablo 4	203,30	1,64	2,00
	San Pablo 5	170,00	1,61	1,95
	Sincelejo 1	121,50	1,58	1,94
	Sincelejo 2	173,10	1,6	1,96
	Sincelejo 3	135,20	1,58	1,94
	Sincelejo 4	191,30	1,61	1,93
	Sincelejo 5	230,60	1,64	1,97
	Zent 1,11	131,90	1,58	1,87
	Zent 2,3	59,00	1,53	1,81
	Zent 2,8	67,60	1,54	1,82
	Zent 2,12	111,80	1,46	1,79
	Zent 5,1	91,70	1,57	1,85
	ZTSC 3	992,40	1,63	1,97
	ZTSC 5	192,00	1,61	1,94
	ZTSC 6	175,40	1,58	1,94
	ZTSC 7	250,90	1,67	1,95
<b>Aislamientos silvestres</b>	ZTSC 11	312,00	1,7	1,94
	ZTSC 12	92,20	1,54	1,8
	ZTSC 13	269,90	1,66	1,97
	ZTSC 18	175,90	1,57	1,94
	ZTSC 27	217,90	1,61	1,95
	ZTSC 30	132,20	1,58	1,84



**Figura 11.** ADN de 65 aislamientos de *P. fijiensis*. Gel de agarosa al 1 %.

En la figura 12 se observa la fotografía del gel de agarosa con los productos de amplificación obtenidos con el set de primers MFcyFor y MFcyRev, los cuales amplificaron un fragmento de 285 pb del gen *cyt b*, que incluye las mutaciones G143A, F129L y G137R asociadas a la resistencia de hongos fitopatógenos a las estrobilurinas.



**Figura 12.** Amplificación de un fragmento del gen *cyt b* de aproximadamente 285 pb de 65 aislamientos de *P. fijiensis*. Gel de agarosa al 1 % 83 V por 45 minutos.

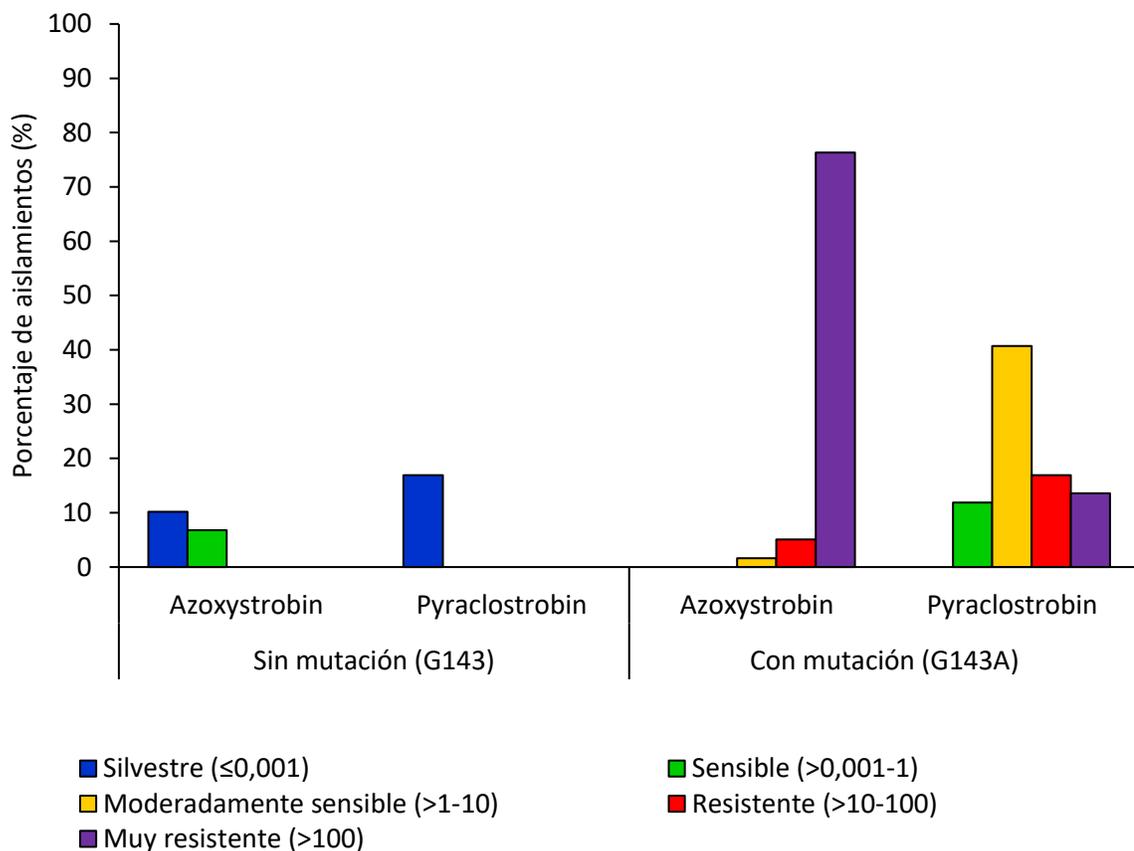
Se realizó la secuenciación completa del fragmento amplificado del gen *cyt b*, obteniéndose una secuencia de 250 nucleótidos para los 65 aislamientos de *P. fijiensis*. Las mutaciones correspondientes a los codones 137 y 129 (G137R, F129L) no se encontraron en ninguno de los aislamientos, sugiriendo la no existencia de dichas mutaciones para *P. fijiensis* y aún menos su posible relación con la resistencia a estrobilurinas en este patógeno (Figura 13). Por su parte, la mutación G143A estuvo ausente en el 100 % de los aislamientos silvestres (de la plantación sin fungicidas), y presente en el 100 % de los aislamientos de fincas comerciales que mostraron resistencia *in vitro* a los fungicidas. Estos resultados demuestran una clara relación entre la presencia de la mutación G143A y la resistencia a estrobilurinas en *P. fijiensis* (Figura 14).

125 129 137 143 150

Aislamientos de fincas comerciales	Balatana_1	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Balatana_2	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Balatana_3	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Balatana_5	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Balatana_10	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Cartagena_1	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Cartagena_2	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Cartagena_5	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Cartagena_8	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Cartagena_9	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Encantos_2	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Encantos_4	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Encantos_3	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Encantos_5	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Encantos_10	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Estrellares_1	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Estrellares_2	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Estrellares_3	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Estrellares_4	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Estrellares_5	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	La_Teresa_1	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	La_Teresa_2	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	La_Teresa_3	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	La_Teresa_4	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	La_Teresa_5	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Palacios_1	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Palacios_5	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Palacios_6	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Palacios_10	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Palacios_13	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Platanera_1	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Platanera_2	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Platanera_3	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Platanera_4	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Platanera_5	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Rebusca_1	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Rebusca_2	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Rebusca_3	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Rebusca_4	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
	Rebusca_10	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL	
San_Pablo_1	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
San_Pablo_2	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
San_Pablo_3	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
San_Pablo_4	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
San_Pablo_5	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
Sincelejo_1	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
Sincelejo_2	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
Sincelejo_3	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
Sincelejo_4	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
Sincelejo_5	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
Zent_1.11	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
Zent_2.8	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		
Zent_2.12	MATAFLGYVLPY	QMSLWAATVITNL		

Aislamientos de fincas comerciales	Zent_2.3	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
		Zent_5.1	MATAFLGYVLPY	G
Aislamientos silvestres	ZTSC_3	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
	ZTSC_5	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
	ZTSC_6	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
	ZTSC_7	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
	ZTSC_11	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
	ZTSC_12	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
	ZTSC_13	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
	ZTSC_18	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
	ZTSC_27	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
	ZTSC_30	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL
Secuencia de referencia	← AF343070.1	MATAFLGYVLPY	G	QMSLWGATVITNL

**Figura 13.** Alineamiento de secuencias traducidas del gen codificante del citocromo b en *P. fijiensis* para el segmento comprendido entre los aminoácidos 125 y 150. Nótese la presencia de la mutación G143A y la ausencia de las mutaciones F129L y G137R.



**Figura 14.** Distribución de los aislamientos de *P. fijiensis* según su sensibilidad a azoxystrobin y pyraclostrobin y por ausencia o presencia de la mutación G143A.

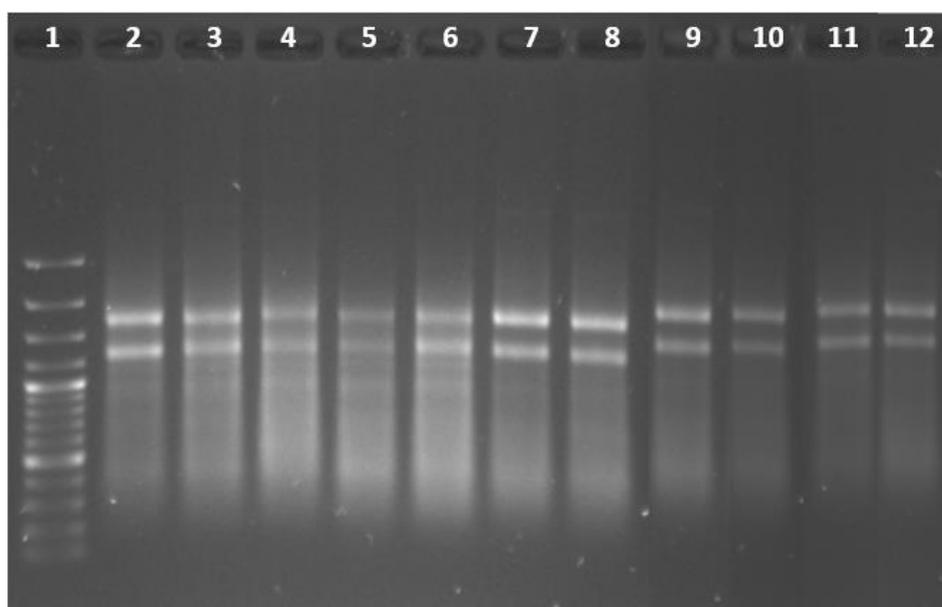
### 4.3.2 Cuantificación de la expresión del gen *cyt b*

#### 4.3.2.1 Extracción de ARN

Empleando la metodología propuesta por Islas *et al.* (2006) y el kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific) se logró obtener ARN de alta calidad y cantidad de los diferentes aislamientos de *P. fijiensis* (Cuadro 11). Asimismo, se verificó la integridad del material genético mediante electroforesis (Figura 15), factor crucial para la posterior retrotranscripción de 100 ng de ARN a ADNc.

**Cuadro 11.** Cantidad y calidad del ARN extraído de aislamientos de *P. fijiensis*.

Aislamiento		ARN		
		Cantidad (ng/ $\mu$ l)	260/280	260/230
Sin mutación (G143)	ZTSC 3	114,10	2,16	1,70
	ZTSC 27	165,60	2,11	1,50
	ZTSC 30	119,20	2,09	2,00
Con mutación (G143A)	Rebusca 3	194,20	2,15	1,70
	Encantos 10	85,50	2,03	2,00
	San Pablo 2	101,40	2,11	2,30
	Estrellales 3	191,20	2,12	1,40
	Encantos 5	74,20	2,07	1,70
	Sincelejo 2	74,20	2,15	2,10
	La Teresa 1	173,40	2,16	2,00
	Platanera 3	98,80	2,17	1,10

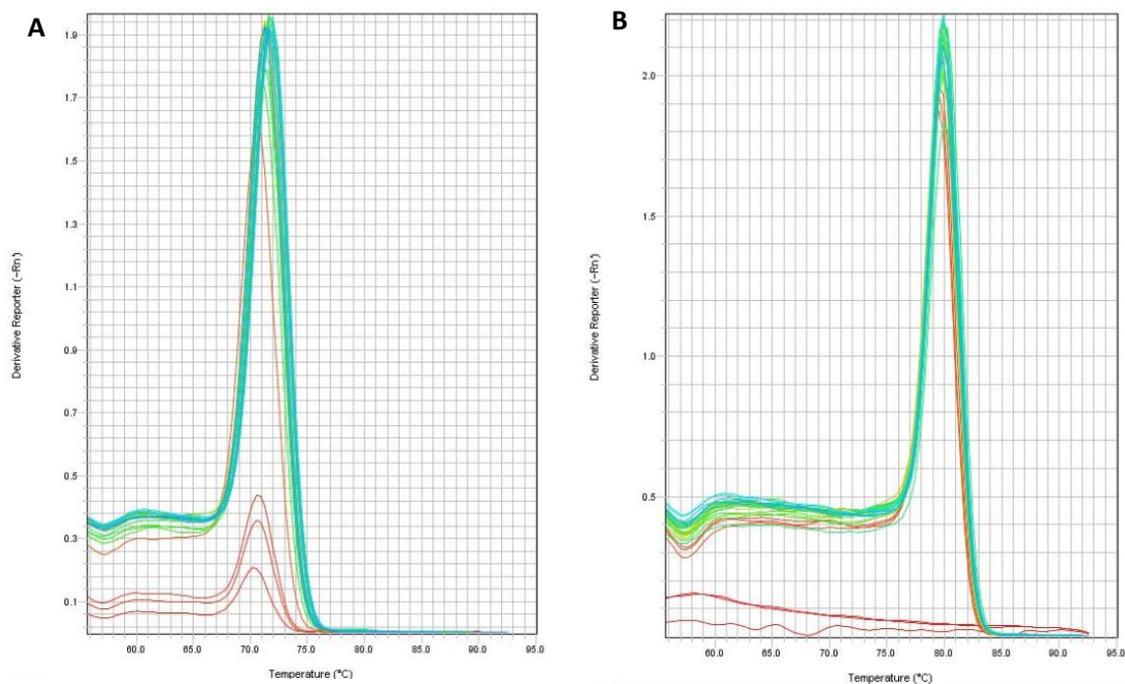


**Figura 15.** Extracción de ARN de *P. fijiensis* según el protocolo propuesto por Islas *et al.* (2006) y tratadas con el kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific). (1) Gene Ruler 100 pb Plus DNA

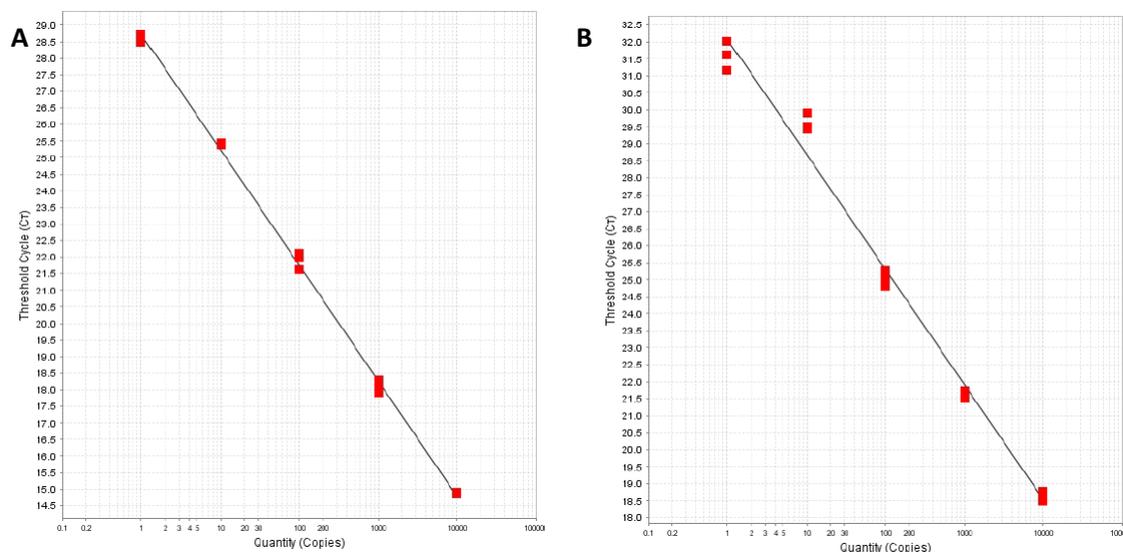
Ladder-ready to use (Fermentas), (2) ZTSC 3, (3) ZTSC 27, (4) ZTSC 30, (5) Rebusca 3, (6) Encantos 10, (7) San Pablo 2, (8) Estrellales 3, (9) Encantos 5, (10) Sincelejo 2, (11) La Teresa 1 y (12) Platanera 3. Gel desnaturalizante de agarosa al 1,2 % con formaldehído al 37 % teñido con GelRed™.

#### 4.3.2.2 Optimización de la qPCR

Todas las reacciones de qPCR llevadas a cabo usando como molde el ADNc dieron lugar a curvas de fusión que fueron analizadas para detectar la posible presencia de artefactos en la reacción. Se utilizó una mezcla de reacción optimizada y cebadores previamente reportados en la literatura que mostraron elevada especificidad, de modo que no se amplificaron productos inespecíficos en ninguna de ellas (Figura 16). La eficiencia de las reacciones para el gen endógeno (actina) y el de interés (*cyt b*) se obtuvieron valores de 97,51 % y 93,80 %, respectivamente. Con un valor de  $R^2$  de 0,987 y 0,998 respectivamente (Figura 17).



**Figura 16.** Curva de fusión de los genes *cyt b* (A) y actina (B). Se observa la amplificación de un solo producto de PCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas.



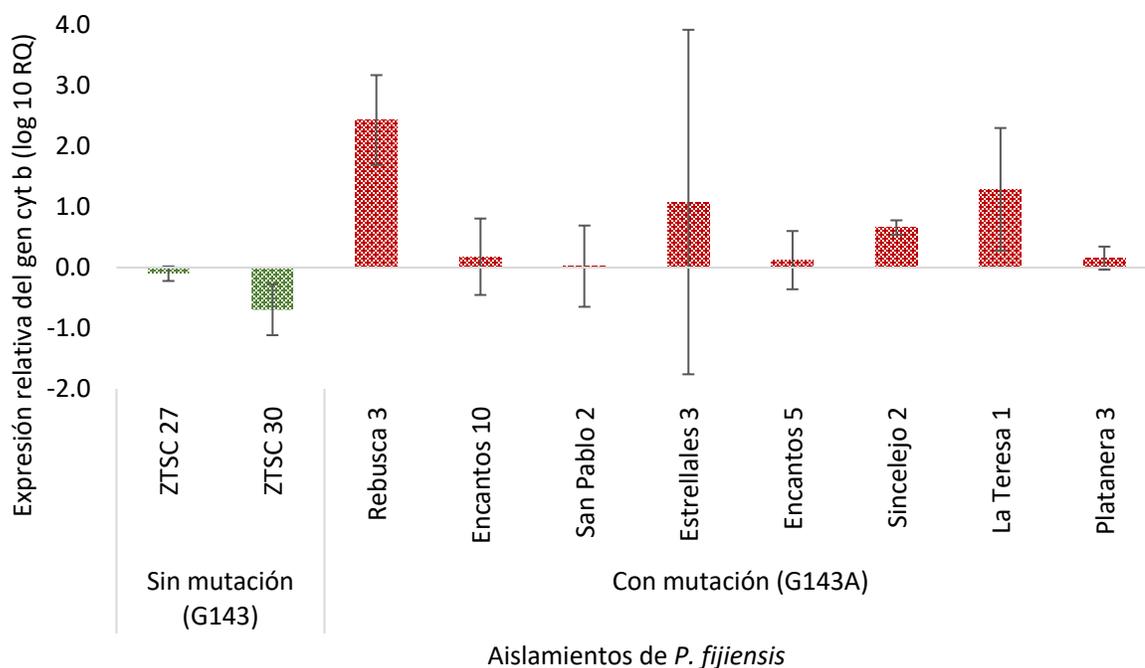
**Figura 17.** Evaluación de la eficiencia de las reacciones en la amplificación del gen *cyt b*. (A) y actina (B).

#### 4.3.2.3 Análisis de la expresión relativa del gen *cyt b*

A continuación se presentan los niveles de expresión relativa del gen *cyt b* en diez aislamientos de *P. fijiensis* (dos silvestres y ocho resistentes) calculados por el método  $\Delta\Delta Ct$  desarrollado por Applied Biosystems en base a la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los valores obtenidos representan el número de veces que se expresa más el gen de interés que el calibrador, que es el mismo gen diana en las condiciones del tratamiento control.

Los ocho aislamientos resistentes evaluados (G143A) presentaron una sobreexpresión del gen *cyt b*, donde todos mostraron una expresión relativa mayor que los aislamientos silvestres y el control (G143), llegando a mostrar niveles de expresión hasta 2,43 veces más (Figura 18). La cuantificación normalizada proporciona información sobre la cantidad de expresión de un gen en valores relativos. Se puede saber cuánto se expresa un gen con respecto a su calibrador. Estos resultados demuestran una posible relación entre la resistencia a estrobilurinas (G143A) y la expresión relativa del gen *cyt b*. Mediante la transformación  $2^{-\Delta Ct}$  se eliminaron las variaciones debidas al efecto “tubo” (diferencias producidas por la degradación parcial del ARN en alguna muestra, distinta eficiencia en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc) al incluir un control endógeno y obtener un valor directamente proporcional a la cantidad total de transcrito de cada gen, se pudo comparar así cantidades de expresión de un gen respecto a otro dentro de una misma cepa, o entre cepas distintas. Además, al eliminar de la ecuación los genes calibradores

se pudo ver su expresión en verdadera magnitud, en lugar de normalizada a un valor constante e igual a 1.

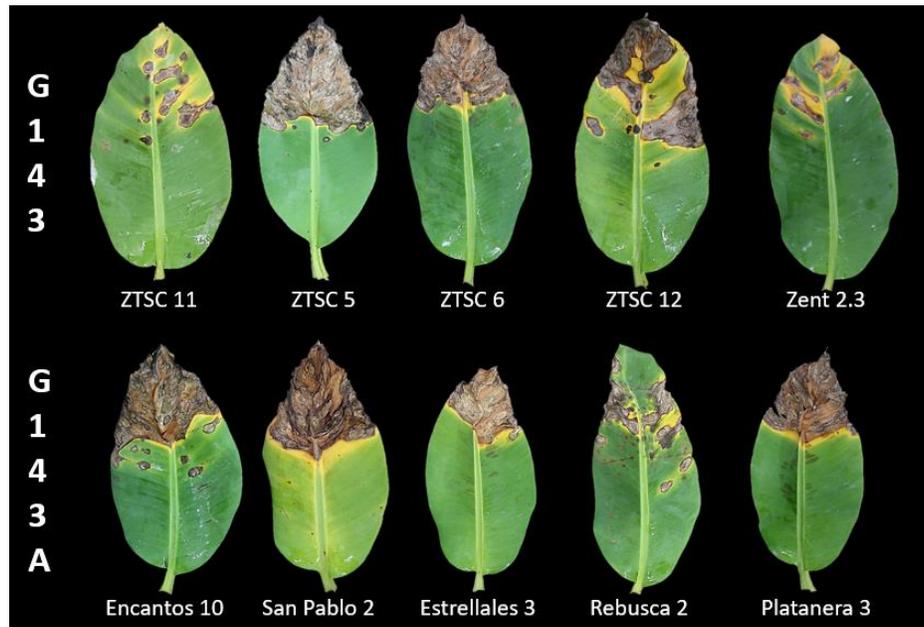


**Figura 18.** Expresión relativa del gen *cyt b* en diez aislamientos de *P. fijiensis* con diferente nivel de resistencia a QoI's. Expresión relativa fue normalizada con el gen de la actina de *P. fijiensis*. Los datos representan el promedio de una repetición biológica con tres repeticiones técnicas.

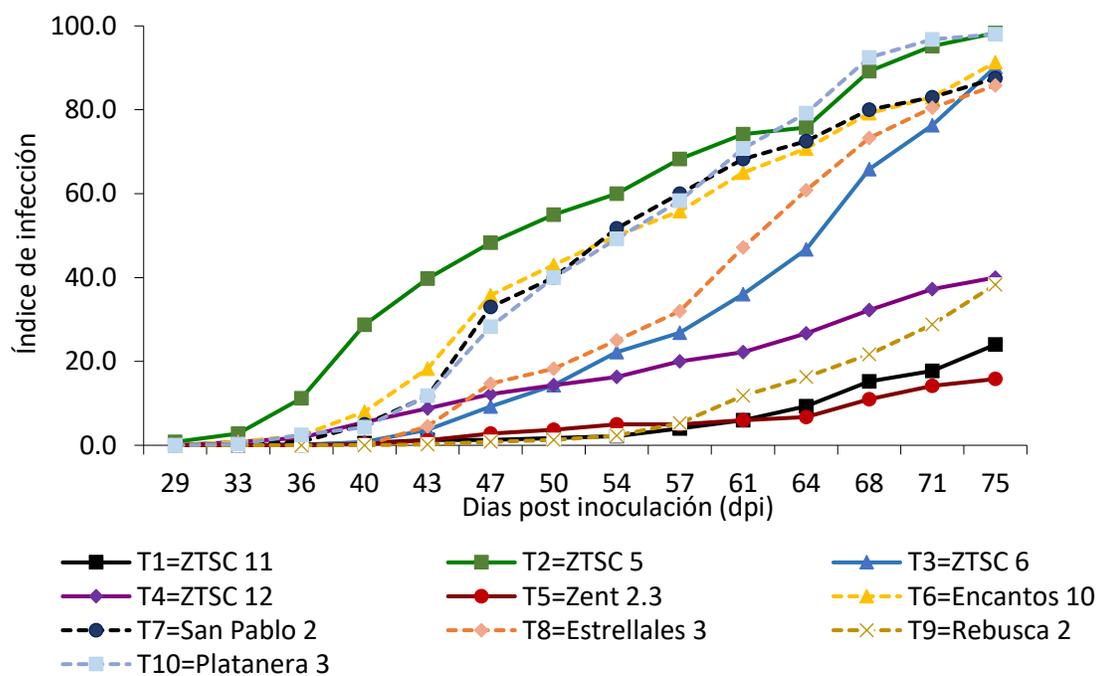
#### 4.4 Etapa IV. Evaluación en invernadero de la patogenicidad y virulencia de aislamientos de *P. fijiensis* con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas

Al obtener una clara relación entre la presencia de la mutación G143A y la resistencia a estrobilurinas en *P. fijiensis* se procedió a evaluar la patogenicidad y virulencia entre aislamientos: cinco silvestres (ZTSC 11, ZTSC 5, ZTSC 6, ZTSC 12 y ZTSC 2.3) sin la mutación G143A, y cinco aislamientos resistentes (Encantos 10, San Pablo 2, Estrellales 3, Rebusca 2 y Platanera 3) con la mutación G143A. El experimento se llevó a cabo durante 75 días post inoculación (dpi) de los aislamientos de *P. fijiensis*, hasta que el primero de estos causara el 100 % de necrosis del área inoculada en todas las repeticiones. En total los diez aislamientos evaluados fueron

patogénicos ya que causaron los síntomas característicos de la enfermedad, sin embargo, presentaron diferencias en su virulencia (Figura 19 y 20).



**Figura 19.** Síntomas de Sigatoka negra observados después de 75 días de inoculación de los diferentes aislamientos de *P. fijiensis*.



**Figura 20.** Curva de infección de 10 aislamientos de *P. fijiensis*, con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas, inoculados en condiciones de invernadero.

Con respecto a la variable de periodo de incubación (PI), en promedio, los aislamientos silvestres (G143) requirieron un menor número de días desde el momento de la inoculación del patógeno hasta presentar los primeros síntomas de la enfermedad en comparación a los aislamientos resistentes (G143A) ( $P= 0,0144$ , Cuadro 12). Los síntomas característicos observados fueron pequeñas puntuaciones de color amarillo visibles por el envés de la hoja. De manera independiente, los aislamientos ZTSC 11 y Zent 2.3 fueron los primeros en presentar los síntomas a los 11 dpi, en comparación con Encantos 10 el cual presentó un PI de 22 días.

Por otra parte, según el análisis de contrastes, no se presentaron diferencias significativas en el periodo de evolución de los síntomas (PES) entre los aislamientos silvestres (G143) y los aislamientos resistentes (G143A) ( $P= 0,17740$ , Cuadro 12). El PES es considerado como un periodo de transición en el cual las estrías se ensanchan, se tornan de un color marrón oscuro y son visibles por el haz y envés de la hoja. En promedio, el periodo de evolución de los síntomas de los aislamientos silvestres fue de 38 días y el de los aislamientos resistentes fue de 36 días, siendo el aislamiento ZTSC 5 el que presentó el menor TES (24 días) y el aislamiento Zent 2.3 el mayor TES (53 días).

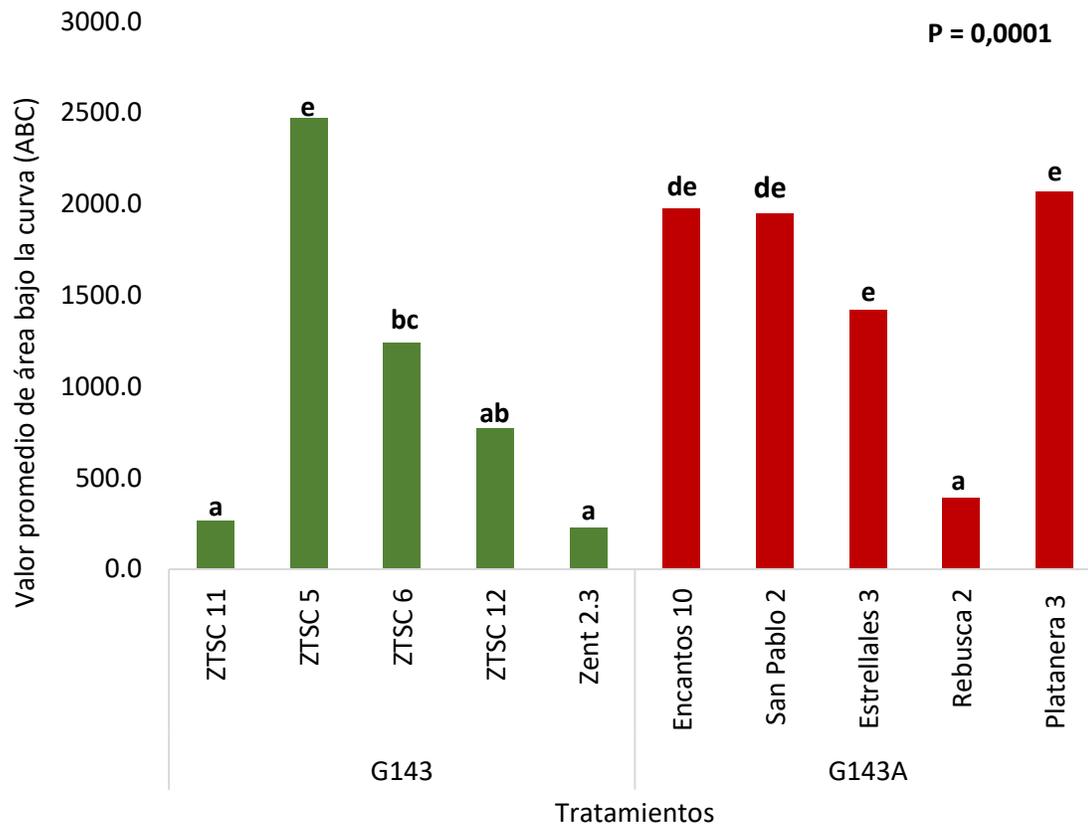
De igual manera, el análisis de contrastes reveló que no se presentaron diferencias significativas en el periodo infeccioso (PIF) entre los aislamientos silvestres (G143) y los aislamientos resistentes (G143A) ( $P= 0,42225$ , Cuadro 12). Este periodo se caracteriza por ser el periodo en el cual los centros de las manchas se tornan de color gris claro y son rodeadas por un anillo negro bien definido, el cual también es a su vez rodeado por un halo amarillo. El aislamiento que alcanzó primero este estadio de la enfermedad fue ZTSC 5 (34 días) en comparación a Rebusca 2 el cual requirió 54 días. Sin embargo, en promedio, los aislamientos silvestres alcanzaron el PIF a los 45 días y los resistentes a los 43 días.

**Cuadro 12.** Variables: período de incubación, período de evolución de los síntomas y período infeccioso de aislamientos de *P. fijiensis* con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas.

Aislamiento	Variables					
	Periodo de incubación (días)		Periodo de evolución de los síntomas (días)		Periodo infeccioso (días)	
ZTSC 11	11,00	a	41,00	cd	51,83	de
ZTSC 5	17,83	bc	28,83	a	35,50	a
ZTSC 6	16,17	abc	36,67	bc	45,50	cd
ZTSC 12	16,33	abc	32,17	ab	38,17	abc
Zent 2.3	11,00	a	53,21	e	53,44	de
Encantos 10	22,17	c	32,83	ab	37,50	ab
San Pablo 2	21,00	bc	35,17	abc	41,50	abc
Estrellales 3	16,33	abc	37,67	bcd	43,67	abc
Rebusca 2	14,67	ab	43,33	d	54,33	e
Platanera 3	16,33	abc	32,83	ab	39,67	abc
<b>Contrastes (Probabilidad) P≥F</b>						
Resistentes (G143A) vs Sensibles (G143)	0,0144		0,1740		0,4225	

\*Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) según la prueba DMS.

Finalmente, en promedio, los aislamientos resistentes (G143A) presentaron una mayor severidad con respecto a los aislamientos silvestres ( $P = 0,0001$ ), esto representado con la sumatoria del área bajo la curva (ABC). De manera independiente, el aislamiento más virulento fue ZTSC 5, con un ABC de 2467,5, mientras que Zent 2.3 fue el de menor virulencia, con un ABC de 227,8 (Figura 21 y 22). Sin embargo, en promedio, los aislamientos silvestres presentaron un ABC menor con respecto a los aislamientos resistentes, 993,4 y 1558,7 respectivamente (Figura 20).



**Figura 21.** Valor promedio de área bajo la curva (ABC) del índice de infección de 10 aislamientos *P. fijiensis* con diferente grado de resistencia a las estrobilurinas inoculados en condiciones de invernadero. Valores con una misma letra no son diferentes estadísticamente (DMS,  $P= 0,05$ ).

## 5 DISCUSIÓN

El combate químico ha sido, hasta la fecha, la principal herramienta en el manejo de la Sigatoka negra. Se realiza mediante la aplicación alterna y en mezcla de fungicidas protectores y sistémicos, entre los cuales se encuentran las estrobilurinas (Marín *et al.* 2003; Pérez 2006, De Lapeyre de Belaire *et al.* 2010). De las estrobilurinas presentes en el mercado en la industria del banano en Costa Rica las moléculas más utilizadas son azoxystrobin, pyraclostrobin y, en menor grado, trifloxystrobin (FRAC 2018). Estos fungicidas muestran su mayor eficacia en el control del patógeno cuando se aplica antes de que ocurra la infección y 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 (Pérez 2006).

Las estrobilurinas fueron introducidas en la industria del banano para el control de Sigatoka negra en el año 1997 y ya en el año 2000 se empezaron a reportar cambios en la sensibilidad del patógeno (Sierotzki *et al.* 2000a, Chin *et al.* 2001). Estos datos concuerdan con lo obtenido mediante la determinación *in vitro* de la sensibilidad de los diferentes aislamientos de *P. fijiensis* a las estrobilurinas, donde se logró identificar una pérdida de sensibilidad del patógeno a pyraclostrobin y azoxystrobin en aislamientos de Costa Rica, así como una resistencia cruzada entre estos fungicidas ( $R^2= 0,4471$ ).

Sierotzki *et al.* (2000a) evidenciaron una pérdida de sensibilidad de *P. fijiensis* en aislamientos de Costa Rica recolectados de plantaciones comerciales en el año 2000 con factores de resistencia  $> 1320$  para azoxystrobin, mientras que en esta investigación para esta molécula se obtuvo un factor de resistencia de 12.747,472. Estos valores de factores de resistencia concuerdan con lo reportado por Degli *et al.* (1993), quienes indican que aislamientos resistentes a las estrobilurinas usualmente expresan altos factores de resistencia, especialmente cuando ocurren cambios genéticos entre los aminoácidos 127-147 del *cyt b*.

De la misma manera, Chin *et al.* (2001), lograron identificar aislamientos de *P. fijiensis* resistentes a las estrobilurinas en Costa Rica entre los años 1997 a 1999, además, lograron demostrar la existencia de una resistencia cruzada en este patógeno entre trifloxystrobin y azoxystrobin. Sin embargo, los autores reportan valores máximos de  $CE_{50} > 3$  para trifloxystrobin mientras que en la presente investigación se lograron detectar valores de hasta  $CE_{50} > 100$  para azoxystrobin y

pyraclostrobin. Lo que revela la pérdida de sensibilidad del patógeno a este grupo de fungicidas en Costa Rica a través del tiempo.

La resistencia a fungicidas es un factor crítico que limita la eficiencia de los programas de manejo integrado del hongo ya que genera un aumento en las dosis y en las frecuencias de aspersiones (Pérez 2006, FRAC 2018). Según FRAC, las estrobilurinas al tener un modo de acción de sitio específico presentan alto riesgo de generar poblaciones del hongo resistentes y muestran resistencia cruzada positiva entre moléculas de este grupo (Bartlett *et al.* 2002, Gisi *et al.* 2002, Grasso *et al.* 2006, Fernández *et al.* 2008, FRAC 2018). Actualmente, la pérdida de sensibilidad de *P. fijiensis* a estrobilurinas está ampliamente distribuida a nivel mundial y se ha reportado en países como Costa Rica, Panamá, Guatemala, Colombia, Ecuador, Honduras y Belice lo cual ha reducido su eficacia en campo y ha limitado su uso (Chin *et al.* 2001, FRAC 2018).

Fernández *et al.* (2008) establece que existen cuatro posibles mecanismos moleculares asociados a la pérdida de sensibilidad de hongos fitopatógenos a las estrobilurinas: mutaciones en el gen *cyt b*, inducción de una respiración alternativa mediante una oxidasa alternativa (AOX), transportadores transmembrana dependientes de ATP (ABC) e intrones tipo I que afectan el proceso de splicing alternativo. De estos, las mutaciones en el gen *cyt b* representa el mecanismo de mayor importancia en la resistencia generada por muchos de los hongos fitopatógenos a las estrobilurinas, entre estos *P. fijiensis* (Sierotzki *et al.* 2000a, Gisi *et al.* 2002, Grasso *et al.* 2006, Fernández *et al.* 2008).

En diferentes organismos (bacterias, algas, levaduras, protozoarios y animales) la resistencia a las estrobilurinas ha sido asociada principalmente a más de once mutaciones en el gen *cyt b* ubicadas entre los aminoácidos 127-147 y 275-296 (Degli *et al.* 1993, Brasseur *et al.* 1996, Gisi *et al.* 2002, Standish *et al.* 2018). De estas sustituciones, la mutación G143A ha sido asociada como la principal causa de pérdida de sensibilidad de hongos fitopatógenos y en menor grado las mutaciones F129L y la G137R, asociadas con pérdidas de sensibilidad más leves (resistencia parcial) (Sierotzki *et al.* 2000a, Bartlett *et al.* 2002, Gisi *et al.* 2002, Grasso *et al.* 2006, Fernández *et al.* 2008).

Específicamente la mutación G143A ha sido reportada en más de veinte especies de hongos como por ejemplo: *Botrytis cinerea*, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordeni*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Pseudoperonospora graminicola*,

*Plasmopara viticola*, *Pseudocercospora fijiensis*, *Venturia inaequalis*, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, *Didymella btyoniae*, *Phytophthora infestans*, *Podosphaera xanthii* y *Alternaria alternata*, *Mycena galopoda* (Kraiczky *et al.* 1996, Fraaije *et al.* 2000, Gisi *et al.* 2000, Heaney *et al.* 2000, Sierotzki *et al.* 2000a, Sierotzki *et al.* 2000b, Zheng *et al.* 2000, Chin *et al.* 2001, Farber *et al.* 2001, Ishii *et al.* 2001, Gisi *et al.* 2002, Steinfeld *et al.* 2002, Ma y Michailides 2003, Grasso *et al.* 2006, Amil *et al.* 2007, Fernández *et al.* 2008, Escudero *et al.* 2009, Fernández *et al.* 2012). Asimismo, la mutación F129L ha sido reportada en *Pyricularia grisácea*, *Phythium aphanidermatum*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Alternaria solani*, *Pyrenophora teres*, *Phytophthora infestans* (Farman 2001, Gisi *et al.* 2002, Escudero *et al.* 2009, Klosowski *et al.* 2015). De igual manera, la mutación G137R ha sido reportada en baja frecuencia en aislamientos de *P. tritici-repentis* (Sierotzki *et al.* 2000b).

Específicamente en *P. fijiensis*, la mutación G143A fue reportada por Sierotzki *et al.* (2000a) en aislamientos monoascospóricos colectados en el año 1997 de plantaciones comerciales de Costa Rica. Al igual que los resultados obtenidos en esta investigación, se demostró que existe una clara relación entre la presencia de la mutación G143A y la resistencia a estrobilurinas en *P. fijiensis*. De igual manera, Sierotzki *et al.* (2000a) no encontraron las mutaciones correspondientes a los codones 137 y 129 (G137R, F129L) sugiriendo la no existencia de dichas sustituciones para *P. fijiensis* y su posible relación con la resistencia a estrobilurinas en este patógeno. Además, los autores no lograron identificar una mezcla de ADN mutado y sin mutar en las mitocondrias de los aislamientos de *P. fijiensis*, lo que indica que al ser un hongo heterotálico con gran capacidad de recombinación genética y una alta presión de selección, posiblemente, se dio una selección de mitocondrias resistentes generando así poblaciones del patógeno poco sensibles a las estrobilurinas (Sierotzki *et al.* 2000a, Fernández *et al.* 2008).

Resultados similares fueron reportados por Amil *et al.* (2007), quienes reportaron la mutación G143A en aislamientos de *P. fijiensis* resistentes a las estrobilurinas obtenidos de plantaciones de Costa Rica. Los autores comprobaron, que no existe una relación entre el número de aplicaciones de estrobilurinas y la frecuencia de la mutación en las fincas comerciales evaluadas. Atribuyendo esto, principalmente, a la importancia del viento en la dispersión del patógeno ya que lograron detectar un desplazamiento de ascosporas resistentes de hasta 6 km de distancia (Amil *et al.* 2007).

Sin embargo, al evaluar la expresión relativa del gen *cyt b* en la presente investigación, se logró identificar una sobreexpresión génica en todos los aislamientos de *P. fijiensis* que mostraron una pérdida de sensibilidad *in vitro* a azoxystrobin y pyraclostrobin lo que revela que, posiblemente, la resistencia de este patógeno a las estrobilurinas puede estar asociado también a este mecanismo molecular no antes reportado para esta familia de fungicidas. La sobreexpresión génica ha sido reportada como uno de los mecanismos de resistencia que causan la pérdida de sensibilidad de hongos fitopatógenos a los fungicidas pertenecientes a la familia de los inhibidores de la desmetilación (DMI's). Específicamente para este grupo, existen cuatro posibles mecanismos moleculares asociados a la pérdida de sensibilidad por parte de diferentes hongos fitopatógenos: sobreexpresión génica, reducción de la concentración intracelular de la molécula fungicida, mutaciones que disminuyen la afinidad del fungicida por su sitio de acción e inactivación de enzimas (De Waard y Van Nistelrooy 1980, Kelly *et al.* 1996, Schnabel y Jones 2000, Chong 2016).

Schnabel y Jones (2000) identificaron una inserción de 553 pb en el promotor del gen *cyp51A1* que causaba una sobreexpresión génica en aislamientos de *Venturia inaequalis* resistentes a los DMI's. Los autores reportan que la sobreexpresión del gen en aislamientos resistentes es el resultado de la amplificación del mismo, de una regulación de la transcripción o un mayor grado de estabilidad del ARNm. Schnabel y Jones (2000) indican que una mayor concentración de ARNm del gen *cyp51A1* en los aislamientos resistentes probablemente genera una mayor concentración de la enzima 14 $\alpha$ -desmetilasa en las células del hongo y que esta sea, posiblemente, la razón de la existencia de un efecto de dosis en la cantidad de fungicida requerida para controlar el patógeno en campo.

Por otra parte, resultados similares fueron obtenidos por Chong (2016) quien estudió la pérdida de sensibilidad de *P. fijiensis* a los DMI's y estableció que existen dos principales mecanismos moleculares asociados a este fenómeno: mutaciones puntuales en el gen *Pfcyp51* y una sobreexpresión génica. El autor logró detectar hasta 28 mutaciones en diferentes aislamientos del patógeno resistentes a este grupo de fungicidas. Además, comprobó una sobreexpresión del gen *Pfcyp51* en aislamientos de *P. fijiensis* con diferente nivel de resistencia a los DMI's debido a inserciones repetidas de 19 pb en el promotor del gen. El autor indica que estas inserciones son un mecanismo de adaptación de los aislamientos resistentes en respuesta a la alta presión

de selección expuesta al patógeno debido a las constantes aplicaciones de este grupo de fungicidas en las plantaciones bananeras evaluadas (Chong 2016).

Según Köller *et al.* (2001), Fernández *et al.* (2008), Fisher y Meunier (2008) y Karaoglanidis *et al.* (2011) las mutaciones en el gen *cyt b* pueden llegar a afectar la efectividad biológica de los organismos patógenos a plantas de manera diferente. Específicamente, los autores establecen que estas modificaciones genéticas podrían generar daños funcionales en la mitocondria provocando una alteración en el flujo de electrones en el complejo *cytbcl* y esto, posiblemente, generaría alteraciones en la eficacia biológica de los organismos que las presentan.

Al evaluar la patogenicidad y virulencia de aislamientos de *P. fijiensis* sensibles y resistentes a las estrobilurinas se logró comprobar que todos fueron capaces de infectar las plantas de banano y causar la enfermedad a pesar de emplear partes de micelio como inóculo. Esto concuerda con lo reportado por Balint- Kurti *et al.* (2001) quienes indican que en el caso particular de *P. fijiensis* no se han encontrado aislamientos no patogénicos. Asimismo, estos autores lograron comprobar la patogenicidad de emplear partes de micelio de *P. fijiensis* como fuente de inóculo en hojas del cultivar susceptible Grande Naine (Balint- Kurti *et al.* 2001). Esto también ha sido validado por Alvarado *et al.* (2003) quienes afirman que la inoculación artificial de siete variedades de plantas de banano (*Musa* spp.), con diferente nivel de resistencia a Sigatoka negra, utilizando una suspensión de micelio resultó ser un método fácil, rápido y factible para conocer la expresión de la resistencia estas plantas contra *P. fijiensis*. Resultados similares fueron obtenidos por Mourichon *et al.* (1987) y Jones (1995).

Conocer la virulencia de un aislamiento resistente a fungicidas es fundamental dentro de un programa de manejo de la enfermedad (Fernández *et al.* 2008). A través del tiempo, la virulencia de un aislamiento ha sido definido como el efecto cuantitativo negativo de un patógeno en su respectivo hospedante (Van Der Plank 1968), el grado del daño causado a un hospedante por la infección de un parásito, lo cual se asume que esté negativamente correlacionado con la salud del hospedante en cuestión (D'arcy *et al.* 2001) o bien el grado o medida de la patogenicidad (Lenne 2002).

En *P. fijiensis* la virulencia de aislamientos resistentes a las estrobilurinas ha sido poco estudiada. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación revelan que, en forma grupal, los aislamientos de este patógeno resistentes a las estrobilurinas (G143A) presentaron una

severidad igual o mayor a los aislamientos sensibles (G143). Brasseur *et al.* (1996) y Gisi *et al.* (2002) indican que la mutación G143A confiere altos niveles de resistencia a las estrobilurinas, sin embargo, no afecta la actividad enzimática en el citocromo *bc<sub>1</sub>*. Al mantenerse la funcionalidad del citocromo *bc<sub>1</sub>*, los autores afirman que la mutación no representaría una penalización en su aptitud física (fitness penalti o fitness cost) y por lo tanto, los individuos resistentes presentarían un fitness igual que un aislamiento silvestre (Brasseur *et al.* 1996, Gisi *et al.* 2002).

Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Karaoglanidis *et al.* (2011) quienes evaluaron la agresividad de aislamientos sensibles (G143) y resistentes (G143A) de *Alternaria alternata* a las estrobilurinas y lograron comprobar que, como grupo, los aislamientos resistentes mostraron una mayor agresividad que los aislamientos sensibles.

Chen *et al.* (2016) evaluaron aislamientos de *Botrytis cinerea* resistentes a diferentes grupos de fungicidas y concluyeron que éstos fueron igual de agresivos que los aislamientos silvestres. De igual manera Forcelini *et al.* (2017), tras evaluar la virulencia de aislamientos de *Colletotrichum acutatum* sensibles y resistentes a las estrobilurinas, no encontraron diferencias significativas entre estos. Los autores reportan que en ausencia de presión de selección, los aislamientos resistentes y sensibles fueron igualmente competitivos (Forcelini *et al.* 2017).

De las enfermedades que afectan el banano a nivel mundial, Sigatoka negra es la más importante y con mayor relevancia económica. El tiempo de generación, cantidad de esporulación, dispersión de esporas, adaptabilidad genética e historia de resistencia permite categorizar a *P. fijiensis* como un hongo de alto riesgo para desarrollar resistencia a fungicidas. Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten conocer con más detalle la biología del patógeno y su resistencia a las estrobilurinas, información fundamental para el diseño de programas de manejo de la enfermedad donde se promueva un uso más racional de los fungicidas y así mantener, hasta donde sea posible, la efectividad de este grupo de fungicidas en el combate de la Sigatoka negra.

## 6 CONCLUSIONES

1. Con la evaluación de aislamientos monoascospóricos se corroboró la pérdida de sensibilidad a azoxystrobin y pyraclostrobin en aislamientos de *P. fijiensis* de plantaciones bananeras de la zona atlántica de Costa Rica. Asimismo, se logró identificar la resistencia cruzada entre estos. Sin embargo, la frecuencia de aislamientos resistentes y altamente resistentes fue mucho mayor en azoxystrobin en comparación a pyraclostrobin.
2. La mutación G143A se logró detectar en el 100 % de los aislamientos de fincas comerciales que mostraron resistencia *in vitro* a las estrobilurinas, lo que revela una clara relación entre ésta y la resistencia a este grupo de fungicidas en *P. fijiensis*. Por otra parte, las mutaciones G137R y F129L no se encontraron en ninguno de los aislamientos, sugiriendo la no existencia de éstas para *P. fijiensis* y aún menos su posible relación con la resistencia a estrobilurinas en este patógeno.
3. Se logró cuantificar una sobreexpresión relativa del gen *cyt b* en aislamientos de *P. fijiensis* con pérdida de sensibilidad *in vitro* a azoxystrobin y pyraclostrobin, lo que revela que posiblemente éste mecanismo molecular esté asociado a la resistencia de este patógeno a las estrobilurinas.
4. En condiciones de invernadero todos los aislamientos de *P. fijiensis* sensibles (G143) y resistentes (G143A) a las estrobilurinas fueron patogénicos. Sin embargo, como grupo, los aislamientos resistentes mostraron una mayor virulencia con respecto a los aislamientos sensibles.
5. La información generada en la presente investigación aporta información valiosa en el conocimiento de la pérdida de sensibilidad de *P. fijiensis* a las estrobilurinas que puede ser utilizada para monitorear las poblaciones del patógeno en el campo y en el diseño de programas de combate de la enfermedad.

## 7 RECOMENDACIONES

1. En experimentos de este tipo, incluir dosis superiores a 100 mg/L en la evaluación de aislamientos de fincas comerciales e inferiores a 0,001 mg/L en la evaluación de aislamientos silvestres, para poder estimar con mayor exactitud su CE<sub>50</sub>.
2. Identificar la presencia de alguna otra mutación (distinta a la G143A, F129L y G137R) que no esté reportada en *P. fijiensis* y que posiblemente pueda estar asociada con la resistencia del patógeno a las estrobilurinas.
3. Evaluar la expresión relativa del gen *cyt b* en un mayor número de aislamientos de *P. fijiensis* con pérdida de sensibilidad *in vitro* a azoxystrobin y pyraclostrobin y secuenciar su promotor para evaluar posibles inserciones que estén generando este fenómeno.
4. Realizar ensayos donde se evalúen parámetros como crecimiento micelial y producción *in vitro* de conidios que, complementado con los resultados de la presente investigación, permitan establecer la existencia de un posible fitness cost asociado a la pérdida de sensibilidad de *P. fijiensis* a las estrobilurinas.

## 8 LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5 ed. Elsevier Academic Press. Florida, USA. 930p.
- Alvarado, Y; Leiva, M; Dita, M.A; Acosta, M; Cruz, M; Portal, N; Gómez, R; García, L; Bermúdez, I; Padrón, J. (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. In: *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook. Proceedings of the Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases, San José, Costa Rica, 20–23 May 2002 (Jacome, L., Lepoivre, P., Marin, D., Ortiz, R., Romero, R. and Escalant, J.V., eds), pp. 169–175. Montpellier: The International Network for the Improvement of Banana and Plantain.
- Alvarez, M. 1991. Resistencia cruzada negativa entre los fungicidas benomilo y dietofencarb en aislamientos de *Botrytis cinerea* de vides. Agricultura Técnica. 51(2): 171-176.
- Amil, A. F; Heaney, S. P; Stanger, C; Shaw, M. W. 2007. Dynamics of QoI sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis* in Costa Rica during 2000 to 2003. Phytopathology 97:1451-1457.
- Anke T, 1995. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. Can J Bot 73: 940–945.
- Arias, P; Dankers, C; Liu, P; Pilkauskas, P. 2004. La economía mundial del banana 1985-2002. Organización de las naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación. Búsqueda 24 de marzo 2018. Disponible en línea: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5102s/y5102s00.pdf>.
- Balint-Kurti, P.J; May, G; Churchill, A. 2001. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions, FEMS Microbiol. Letters 195: 9-15.
- Barrios M. 2006. Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano. Tesis Magister Scientiae

- en Agricultura Ecológica. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 68p.
- Bartlett, D; Clough, J; Godwin, J; Hall, A; Hamer, M; Dobrzanski, B. 2002. Review: The strobilurin fungicides. *Pest. Manag. Sci.* 58: 649-662.
- Beckerman, J. 2013. Detection of fungicide resistance (en línea). Consultado 26 nov. 2014. Disponible en <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44733.pdf>
- Bellón, D. 2014. Nuevas Perspectivas Moleculares y Agronómicas de la Resistencia a Fungicidas en *Podosphaera fusca*. Tesis para optar por el grado de Doctor en Biología, Universidad de Málaga, España, 31 p.
- Brandfass, C; Karlovsky, P. 2008. Upscaled CTAB-Based DNA Extraction and Real-Time PCR Assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in Plant Material with Reduced Sampling Error. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 2306-2321; DOI: 10.3390/ijms9112306.
- Brasseur, G; Saribas, AS; Daldal, F. 1996. A compilation of mutations located in the cytochrome b subunit of the bacterial and mitochondrial bc1 complex. *Biochim Biophys Acta* 1275:61-69.
- Brechtbuehl, K; Whalley, S; Dusheiko, G; Saunders, N. 2001. A rapid realtime quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods.* 93: 105-113.
- Brent, K; Hollomon, D. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? 2 ed. Bruselas, Bélgica. FRAC. 55p.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193.
- Canto, B. 2012. Innovaciones para el manejo integrado en campo de la Sigatoka negra en México. Aportaciones de la investigación básica. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. I ED. 46 p.
- Castillo, D; Macedo, G; Odriozola, O; García, A; Torres, R; Gómez, A; Beltrán, M. 2012. Consideraciones del análisis de resistencia de *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas en

- México: Recomendaciones para los productores. En Innovaciones para el manejo integrado en campo de la Sigatoka negra en México. Aportaciones de la investigación básica. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. I ED. 46 p.
- Champion, J. 1968. El plátano. Trad. F Palomeque. 1 ed. Barcelona, España. Editorial BLUME. 15, 17-18p.
- Chen, S. N; Luo, C. X; Hu, M. J; Schnabel, G. 2016. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* isolates with resistance to multiple chemical classes of fungicides. *Phytopathology* 106:997-1005.
- Chillet, M; Abadie, C; Hubert, O; Chilin-Charles, Y; De Lapeyre de Bellaire L. 2008. Sigatoka disease reduces the greenlife of bananas. *Crop Protection*. Doi:10.1016/j.cropro.2008.08.008.
- Chin, K; Wirz, M; Laird, D. 2001. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from Banana to Trifloxystrobin. *Plant Disease*. 85(12): 1264-1270.
- Chong, P. 2016. The origin, versatility and distribution of azole fungicide resistance in the banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL, 290 p. DOI: 10.18174/387237.
- 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
- Chong, P. 2016. The origin, versatility and distribution of azole fungicide resistance in the banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL. 290 p.
- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). 2019. Estadísticas bananeras (en línea). Consultado 20 abr. 2019. Disponible en <https://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananeras>.
- Churchill, A. 2011. Pathogen profile *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: 307-328.

- Damicone, J. 2004. Fungicide Resistance Management. Oklahoma State University. f-7663, 7 p.
- D'arcy, C.J; Eastburn, D.M; Schumann, G.L. 2001. Illustrated glossary of plant pathology. The Plant Health Instructor, Doi: 10.1094/phi-1-2001-0219-01.
- Degli, M; De Vries, S; Crimi, M; Ghelli, A; Patarnello, T; Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1143:243-271.
- Dekker, J. 1982. Introduction, pp. 1-6. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, The Netherlands.
- De Waard, M. 1997. Significance of ABC transporters in fungicides sensitivity and resistance. *Pesticide Science*. 51(3): 271-275.
- De Waard, M.A.; Van Nistelrooy, J.G.M. 1980. An energy dependent efflux mechanism for fenarimol in a wild-type strain and fenarimol resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 13: 255-266.
- Edwards, K.J. 2004. Real-Time PCR; an Essential Guide. Horizon Bioscience.
- Escudero, M; Marín, M; Jaramillo, S; Cotes, J.M. 2009. Metodología de evaluación de la sensibilidad a fungicidas QoI – fenamidone: caso de estudio *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 62(1): 4773-4782.
- Etebu, E; Young-Harry, W. 2011. Control of black Sigatoka disease: Challenges and prospects. *African Journal of Agricultural Research*. 6(3): 508-514.
- Farber, R; Chin, K; Leadbitter, N. 2001. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Manage. Sci.* 53:261-267.
- Farman, M.L. 2001. The molecular basis of field resistance to QoI fungicides in *Pyricularia grisea*. *Phytopathology* 91:110 (abstr).
- Fernández, D; Torés, J; De Vicente, A; Pérez, A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* 11: 1-9.
- Fernández-Ortuño, D; Chen, F; Schnabel, G. 2012. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Dis.* 96:1198-1203.

- Fisher, N; Brown, AC; Sexton, G; Cook, A; Windass, J; Meunier, B. 2004. Modeling the Qo site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b. *Eur J Biochem* 271: 2264-2271.
- Fisher, N; Meunier, B. 2008. Molecular basis of resistance to cytochrome bc 1 inhibitors. *FEMS Yeast Res*, 8: 183–192.
- Flores, EM; Soto, M; Bolaños, R. 1985. Variación estacional del sistema foliar de cinco clones de banano. *Turrialba*, 35 (4): 339-346.
- Forcelini, B; Rebello, C; Wang, N.Y; Peres, N. 2017. Fitness, competitive, ability and mutation stability of isolates of *Colletotrichum acutatum* from strawberry resistant to QoI fungicides. *Phytopatology*, 108: 462-468.
- Fouré, E. 1985. Black leaf streak Disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet), Study of the symptoms and stages of the disease in Gabón. IRFE, París.
- FRAC. 2018. Banana FRAC Minutes. In Banana Working Group Meeting (2018, Miami, Florida, USA) Summary and recommendations. Miami, USA. 20 p.
- Fraaije, B; Butters, J; Hollomon, D. 2000. In planta genotyping of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* isolates for strobilurin resistance using a fluorimetric allele-specific PCR assay. In: Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis. BCPC, Brighton, UK.
- Frison E; Sharrock S. 1999. The economic, social and nutritional importance of banana in the world. *Banana and Food Security*. Montpellier: INIBAP, 21-35p.
- 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 03 mayo 2018. Disponible en: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/26030/InTech-An\\_integrated\\_approach\\_to\\_control\\_the\\_black\\_leaf\\_streak\\_disease\\_blsd\\_of\\_bananas\\_while\\_reducing\\_fungicide\\_use\\_and\\_environmental\\_impact.pdf](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)
- Georgopoulos, S. 1982. Detection and measurement of fungicide resistance. pp. 25-30. En: Dekker, J; Georgopoulos, S (eds). *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen, The Netherlands, 1982.

- Gisi, U; Chin, KM; Knapova, G; Küng Färber, R; Mohr, U; Parisi, S; Sierotzki, H; Steinfeld, U. 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protect* 19:863–872.
- Gisi, U; Sierotzki, H; Cook, A; McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58(9): 859-867.
- 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. Ing. Agronomía. ITCR, San Carlos, C.R. 99 p.
- Grasso, V. 2005. Characterization of the cytochrome b gene in plant pathogenic basidiomycetes and consequences for QoI resistance. Zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel. 122 p.
- 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 abril 2018. Disponible en [http://www.Musalit.org/pdf/IN030027\\_es.pdf](http://www.Musalit.org/pdf/IN030027_es.pdf).
- Guzmán, M. 2003. Epidemiología de la Sigatoka negra y el sistema de preaviso biológico. p 26-27 en Taller INIBAP, Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos.
- Guzmán, M. 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. P. 83-91. En: XVII Reunión Internacional ACORBAT (2006, Joinville, Brasil). Memorias. Joinville: Acorbat/Acafruta. Vol. 1.
- Guzmán, M; Orozco, M; Pérez, L. 2013. Las enfermedades Sigatoka de las hojas del banano: dispersión, impacto y evolución de las estrategias de manejo en América latina y el Caribe P. 98-116. En: XX Reunión Internacional ACORBAT (2013, Brasil).
- Heaney, SP; Hall, AA; Davies, SA; Olaya, G. 2000. Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives, in Proc Brighton Crop Protect Conf—Pests Dis, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp 755–762.

- Heid, C.A; Stevens, J; Livak, K.J; Williams, PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Heslop-Harrison, J; Schwaracher, T. 2007. Domestication, Genomics and Future for Banana. *Annals of Botany* 100: 1073-1084.
- Higuchi, R; Dollinger, G; Walsh, PS; Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*,10: 413-417.
- Hollomon, DW; Wheeler, IE. 2002. Controlling powdery mildews with chemistry. In: *The powdery mildew. A comprehensive treatise*. APS Press. St. Paul, MN, USA, 249-255.
- Huggett, J; Dheda, K; Bustin, S; Zumla, A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6: 279-284.
- Ishii, H; Fraaije, BA; Sugiyama, T; Noguchi, K; Nishimura, K; Takeda, T; Amano, T; Hollomon, DW. 2001. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91:1166–1171.
- Islas, I; Peraza, L; Canto, B; Rodríguez, C. 2006. Extraction of High-Quality, Melanin-Free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA Preparation. *Molecular Biotechnology*, 34: 45-50.
- Jones D.R. 1995. Rapid assessment of *Musa* for reaction to Sigatoka disease. *Fruits* 50(1):11-22.
- Jones, D.R. 2000. Sigatoka. *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. CAB Internacional, Wallingford, UK.
- Karaoglanidis, G. S; Luo, Y; Michailides, T. J. 2011. Competitive ability and fitness of *Alternaria alternata* isolates resistant to QoI fungicides. *Plant Dis*. 95:178-182.
- Kelly, S.L; Lamb, D.C; Kelly, D.E; Loeffler, J; Einsele, H. 1996. Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. *Lancet* 384: 1523-1524.
- Kitume, K. 2002. Estrategias para el manejo integrado de la producción platanera y control de la Sigatoka negra en la República Democrática de Congo. *INFOMUSA* 11(1): 3-7.

- Klosowski, A; DeMio L; Miessner, S; Rodrigues, R; Stammler G. 2015. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Manag Sci*. DOI 10.1002/ps.4099.
- Köler, W. 2000. Fungicide resistance. 2: 483-488. *Encyclopedia of plant pathology*. John Wiley and Sons. 1368 p.
- Köller, W; Avila-Adame, C; Olaya, G; Zheng, D. 2001. Resistance to strobilurin fungicides. *Agrochemical Resistance—Extent, Mechanism, and Detection*. J. M. Clark and I. Yamaguchi, eds. American Chemical Society. 215-229.
- Kraiczky, P; Haase, U; Gencic, S; Flindt, S; Anke, T; Brandt, U; Von Jagow, G. 1996. The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome bc1 complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center Qp inhibitors. *Eur J Biochem* 235:54-63.
- Lapeyre, L; Fouré, E; Abadie, C; Carlier, J. 2010. Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. *Fruits*. 65: 327-342.
- Lenne, J.M. 2002. *Glosary of plant pathological terms*. CAB International. *Plant pathologist's Pocketbook* (eds. Waller JM, Lenne JM, Waller SJ): 470-486.
- Liu, W; Saint, A.A. 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry* 302: 52-59.
- Livak, KJ; Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Lorenzo, C.D; Prendes, C; Rodríguez, M.A; Blesa, A.C. 1978. Contribución al estudio de la platánea canaria estomas y su distribución en la epidermis foliar. *Anat. y Fisiol.* 37(11-12): 1131-1144.
- Ma, Z. H; Michailides, T. J. 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pestic. Biochem. Physiol.* 77:66-74.
- Marín, D; Romero, R; Guzmán, M; Sutton, T. 2003. Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*. 87(3): 208-223.

- Martínez, L; Villalta, R; Soto, E; Murillo, G; Guzmán, M. 2011. Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano (en línea). Consultado 08 mayo 2018. Disponible en <http://www.infoagro.net/programas/Ambiente/pages/adaptacion/casos/Sigatoka.pdf>.
- Manzo, G; Guzmán, S; Rodríguez, C; James, A; Orozco, M. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. Revista Mexicana de Fitopatología, enero-junio, ano/vol.23 (001).p.86-96.
- Meredith, DS; Lawrence, JS. 1969. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial states of causal fungus. Transaction British Mycological Society 52(3): 459-476.
- Mourichon, X; Peter, D; Zapater, M. 1987. Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture *in vitro*. Fruits 42:195-198.
- Mourichon, X; Carlier, J; Fouré, E. 1997. Enfermedades de Sigatoka: Raya negra de la hoja (Sigatoka negra) Enfermedad de Sigatoka (Sigatoka amarilla). Hoja divulgativa N°8, PROMUSA.
- Muller, P. Y; Janovjak, H; Miserez, A; Dobbie, Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. BioTechniques 32: 1372-1379.
- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 262: 56-61.
- 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.
- Murillo, J. 2015. Efecto de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la eficacia biológica de fungicidas sistémicos utilizados contra la Sigatoka negra. Tesis Lic. Ing. Agronomía. ITCR, San Carlos, C.R. 176 p.

- Ngando, J; Rieux, A; Nguidjo, O; Pignolet, L; Dubois, C; Mehl, A; Zapater, M; Carlier, J; De Lapeyre de Bellaired, L. 2014. A novel and more reliable bioassay to monitor fungicide sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis*. Pest Management Science. Doi: 10.1002/ps.3825.
- Orozco, M; García, K; Manzo, G; Guzmán, S; Martínez, L; Beltrán, M; Garrido, E; Torres, J; Canto, B. 2013. La Sigatoka negra y su manejo integrado en banano. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. Libro N° 1, 152p.
- Ortiz, R; López, A; Ponchner, S; Segura, A. 2001. El cultivo del banano. EUNED. San José, Costa Rica.
- Peirson, S. N; Butler, J; Foster, R. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. Nucleic Acids Research 31: e73.
- Pérez, L; Álvarez, J; Pérez, M. 2003. Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en Cuba: Impacto económico, resistencia de los clones y manejo de la enfermedad. Fitosanidad. 7(1): 31-41.
- 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.
- Pérez, L. 2006. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra en bananos: estado actual y perspectivas. Fitosanidad. 10(1):55-72.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. Nucleic Acids Research 29: e45.
- Pfaffl, M. W; Tichopad, A; Prgomet, C; Neuvians, T. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters 26: 509-515.
- Ramírez, M; Marín, M; Jaramillo, S; Cotes, J. 2009. Metodología de evaluación de la sensibilidad a fungicidas QoI – Fenamidone: Caso de estudio *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Rev.Fac.Nal.Agr. Medellín 62 (1): 4773-4782.

- Reimann, S; Deising HB. 2005. Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3269–3275.
- Ririe, K.M; Rasmussen, R.P; Wittwer, CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
- Rivas, 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.
- Robinson, J.C. 1996. Bananas and Plantains. Wallingford, South Africa. CAB International. 8 p.
- Rodríguez, A; Cayón, G. 2008. Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana.* 26(2): 256-265.
- Rodríguez, A; Uva, V; Valle, H; Segura, R; Guillén, C; Sandoval, J; Laprade S. 2011. Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas para Reducir el Escurrimiento de Plaguicidas en el Cultivo del Banano de la Región Caribe Costarricense. Reporte de Estudio de Caso. CORBANA, S.A. 65p.
- Romero, R. 1997. Avances en epidemiología y manejo de la Sigatoka negra del banano. *Agronomía Costarricense* 21(1): 77-81. Romero, R; Sutton T. 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of Black Sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Dis.* 82(8): 931-934.
- 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.
- Romero, R. 2006. Caracterización y manejo de la resistencia a fungicidas en *Mycosphaerella fijiensis* en bananos. In: XVII Reunión ACORBAT (2006, Joinville, Santa Catarina, BR). Memorias. Joinville, BR. 1: 92-99p.

- Romero, R; Guzmán M. 2006. Efectos de la enfermedad de la Sigatoka negra en la producción y la Calidad. Congreso Internacional Manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica. pp 18.
- Sandoval, J; Muller, L. 1999. Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa AAA*). Revista CORBANA 24(51): 43-59.
- Sánchez, R; Algora, J; Vallin, C; Pérez, M; Iznaga, F; Malpartida, F. 2002. Efecto del fungicida natural F20 contra la enfermedad Sigatoka negra 79 (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (AAB) y banano (AAA). INIBAP. INFOMUSA. 11(1): 14-16.
- Schnabel, G; Jones, A.L. 2000. The 14  $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. Phytopathology 91: 102-110.
- Scot, N. 2008. Black Leaf Streak of Banana (en línea). Plant Disease. Consultado 05 mayo 2018. Disponible en <http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-50.pdf>
- Selim, S. 2009. Allele-specific real-time PCR for quantification and discrimination of sterol 14  $\alpha$ -demethylation-inhibitor-resistant genotypes of *Mycosphaerella graminicola*. Journal of Plant Pathology. 91 (2), 391-400.
- Sierotzki, H; Parisi, S; Steinfeld, U; Tenzer, I; Poirey, S; Gisi, U. 2000a. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc<sub>1</sub> enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. Pest Manage. Sci. 56: 833-841.
- Sierotzki, H; Wullschleger, J; Gisi, U. 2000b. Point-mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. Pestic Biochem Physiol 68:107–112.
- Silveira, L; Bibiano, L; Ferreira, G; Eiji, R; Mizubuti, E. 2014. Baseline sensitivity of Brazilian *Mycosphaerella fijiensis* isolates to protectant and systemic fungicides. Tropical Plant Pathology. 39(2): 172-177.
- Soto, M. 1992. BANANOS: Cultivo y Comercialización. 2ed. San José, Costa Rica. Litografía e imprenta LIL, S.A. 21p.

- Standish, J.R; Brenneman, T.B; Stevenson, K. 2018. Quantifying the effects of a G137S substitution in the cytochrome bc1 of *Venturia effusa* on azoxystrobin sensitivity using a detached leaf assay. Plant Disease, first look, 24p.
- Steinfeld, U; Sierotzki, H; Parisi, S; Gisi, U. 2002. Comparison of resistance mechanisms to strobilurin fungicides in *Venturia inaequalis*, in Modern fungicides and antifungal compounds III, ed by Lyr H, Russell PE, Dehne H-W, Gisi U and Kuck KH, 13<sup>th</sup> International Reinhardsbrunn Symposium.
- Stover, R.H. 1963. Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola*: Associated ascomycetous fungi. Canadian Journal of Botany, 41(10): 1481-1485.
- Stover, R. 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantains. Plant Diseases, 64: 750- 756.
- Stover, R; Simmonds N. 1987. Bananas. Willey & Sons, New York.
- Tamay de Dios, L; Ibarra, C; Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad, 2 (2): 70-78.
- Van Der Plank, J. 1968. Disease resistance in plants — New York : Academic Press, 206 p.
- Wang, A.M; Doyle, M.V; Mark, D.F. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86: 9717-9721.
- Zheng, D; Olaya, G; Koeller, W. 2000. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin related fungicide kresoxim-methyl. Curr. Genet. 38:148-155.

## 9 ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis de sensibilidad a azoxystrobin y pyraclostrobin de poblaciones de *P. fijiensis* en diferentes fincas comerciales y la plantación silvestre antes de iniciar la investigación (Fuente: Corbana 2019).

Finca	Fungicida	Porcentaje de inhibición (mg/L)						Log, Natural	EC50
		0,001	0,01	0,1	1	10	100		
San Pablo	Azoxystrobin	37,292	62,001	71,400	75,341	76,150	79,838	-6,440	0,002
	Pyraclostrobin	39,212	52,602	76,705	82,617	93,633	99,899	-5,645	0,004
La Teresa	Azoxystrobin	17,745	24,693	45,965	45,965	57,830	81,133	-0,291	0,748
	Pyraclostrobin	25,869	38,215	51,096	66,061	79,957	99,466	-2,755	0,064
Cartagena	Azoxystrobin	24,515	45,040	52,109	57,754	67,161	78,449	-2,135	0,118
	Pyraclostrobin	14,139	27,423	49,943	76,853	91,448	98,518	-2,374	0,093
Balatana	Azoxystrobin	40,010	50,634	59,405	61,404	64,474	83,526	-4,210	0,015
	Pyraclostrobin	30,848	43,811	49,903	71,296	90,741	99,951	-3,441	0,032
Palacios	Azoxystrobin	39,658	51,477	64,282	69,984	74,080	76,931	-5,101	0,006
	Pyraclostrobin	42,613	48,004	51,581	67,911	86,884	94,246	-4,284	0,014
Sincelejo	Azoxystrobin	-10,106	-9,045	16,192	38,917	52,708	54,048	2,844	17,180
	Pyraclostrobin	21,887	28,420	32,217	43,942	59,296	84,701	-0,203	0,820
Rebusca	Azoxystrobin	4,076	7,929	25,349	27,415	39,308	51,424	4,678	>100,000
	Pyraclostrobin	6,868	11,893	19,040	25,572	53,713	91,513	1,060	2,880
Encantos	Azoxystrobin	4,941	10,780	28,355	45,368	46,715	47,614	3,465	31,970
	Pyraclostrobin	1,235	3,144	23,526	27,737	35,149	80,741	2,315	10,130
Platanera	Azoxystrobin	14,943	29,447	32,950	48,002	51,341	63,492	1,320	3,740
	Pyraclostrobin	26,710	27,148	37,219	49,754	78,435	97,373	-1,581	0,210
ZTSC	Azoxystrobin	68,287	97,688	97,807	97,985	98,577	100,000	-22,816	<0,001
	Pyraclostrobin	77,771	98,992	99,763	100,000	100,000	100,000	-33,617	<0,001

\*Dosis discriminante para azoxystrobin y pyraclostrobin en Costa Rica: 10 mg/L.

**Anexo 2.** Valores de CE<sub>50</sub> (mg/L) de los aislamientos monoascospóricos de *P. fijiensis* para azoxystrobin y pyraclostrobin.

N°	Código del Aislamiento	CE <sub>50</sub>	
		Azoxystrobin	Pyraclostrobin
1	Balatana 1	>100,000	4,480
2	Balatana 2	0,001	44,700
3	Balatana 3	>100,000	3,320
4	Balatana 5	>100,000	4,050
5	Balatana 10	>100,000	0,060
6	Cartagena 1	>100,000	60,300
7	Cartagena 2	36,600	2,710
8	Cartagena 5	>100,000	3,810

9	Cartagena 8	>100,000	0,090
10	Cartagena 9	>100,000	9,970
11	Encantos 2	>100,000	1,490
12	Encantos 3	>100,000	14,870
13	Encantos 4	>100,000	1,390
14	Encantos 5	>100,000	54,500
15	Encantos 10	>100,000	0,040
16	Estrellares 1	>100,000	7,380
17	Estrellares 2	>100,000	40,440
18	Estrellares 3	>100,000	12,180
19	Estrellares 4	>100,000	1,800
20	Estrellares 5	>100,000	24,530
21	La Teresa 1	>100,000	100,00
22	La Teresa 2	>100,000	0,200
23	La Teresa 3	>100,000	83,090
24	La Teresa 4	>100,000	3,320
25	La Teresa 5	>100,000	0,300
26	Palacios 1	>100,000	>100,000
27	Palacios 5	>100,000	6,700
28	Palacios 6	>100,000	66,600
29	Palacios 10	>100,000	0,120
30	Palacios 13	13,46	>100,000
31	Platanera 1	>100,000	>100,000
32	Platanera 2	>100,000	>100,000
33	Platanera 3	>100,000	>100,000
34	Platanera 4	>100,000	>100,000
35	Platanera 5	>100,000	1,460
36	Rebusca 1	>100,000	2,450
37	Rebusca 2	>100,000	40,440
38	Rebusca 3	>100,000	0,400
39	Rebusca 4	>100,000	9,480
40	Rebusca 10	>100,000	2,450
41	San Pablo 1	>100,000	>100,000
42	San Pablo 2	>100,000	1,320
43	San Pablo 3	1,300	26,570
44	San Pablo 4	0,001	0,980
45	San Pablo 5	>100,000	1,340
46	Sincelejo 1	>100,000	1,200
47	Sincelejo 2	>100,000	>100,000
48	Sincelejo 3	13,060	1,910
49	Sincelejo 4	>100,000	2,450
50	Sincelejo 5	>100,000	1,220
51	Zent 1.11	>100,000	3,000

52	Zent 2.3	0,001	0,001
53	Zent 2.8	>100,000	3,320
54	Zent 2.12	>100,000	2,710
55	Zent 5.1	0,001	0,001
56	ZTSC 3	0,013	0,001
57	ZTSC 5	0,022	0,001
58	ZTSC 6	0,001	0,001
59	ZTSC 7	0,001	0,001
60	ZTSC 11	0,010	0,001
61	ZTSC 12	0,001	0,001
62	ZTSC 13	0,049	0,001
63	ZTSC 18	0,001	0,001
64	ZTSC 27	0,001	0,001
65	ZTSC 30	0,001	0,001

**Anexo 3.** Distribución por finca de los aislamientos de *P. fijiensis* según su valor de CE<sub>50</sub> para azoxystrobin y pyraclostrobin.

Clasificación por CE <sub>50</sub>	Fincas comerciales		Aislamientos silvestres	
	Azoxystrobin	Pyraclostrobin	Azoxystrobin	Pyraclostrobin
Silvestre (≤ 0,001)	1-Balatana			
	1-Palacios	2 - Zent	6 - ZTSC	10 - ZTSC
	1-San Pablo			
	1-Zent			
Sensible (>0,001 - 1)	-	1-Balatana		
		1-Cartagena		
		1-Encantos	4 - ZTSC	
		2-La Teresa		
		1-Palacios		
		1-Rebusca		
Moderadamente sensible (> 1- 10)	1-San Pablo	1-San Pablo		
		3-Balatana		
		3-Cartagena		
		2-Encantos		
		2-Estellales		
		1-La Teresa		
		1-Palacios		
		1-Platanera		
		3-Rebusca		
		2-San Pablo		
4-Sincelejo				
3-Zent				

Resistente (>10-100)	1-Cartagena	1-Balatana		
	1-Palacios	1-Cartagena		
	1 -Sincelejo	2-Encantos		
		3-Estellales	-	-
		1-La Teresa		
		1-Palacios		
Muy Resistente (>100)		1-Rebusca		
		1-San Pablo		
	4-Balatana			
	4-Cartagena			
	5-Encantos			
	5-Estellales	1-La Teresa		
	5-La Teresa	2-Palacios		
	4-Palacios	4-Platanera	-	-
	5-Platanera	1-San Pablo		
	5-Rebusca	1-Sincelejo		
	3-San Pablo			
	4-Sincelejo			
	3-Zent			

**Anexo 4.** Programa de fertilización. Recomendación del Eje Suelo – Planta de Corbana.

Semana	Producto	Dosis (g/planta)	Componentes
0	DAP o MAP	60 - 65	Nitrógeno y fósforo
1	Nitrato de calcio	50	Calcio y nitrógeno
2	Nitrato de amonio	50	Nitrógeno
3	Kmag	50	Potasio, azufre y magnesio
4	Nitrato de amonio calcáreo	50	Nitrógeno, calcio, magnesio
5	Sulfato de Zn + nitrato de K	10+40	Nitrógeno, potasio, azufre, zinc
6	Ulexita + nitrato de K	5+40	Nitrógeno, potasio, boro
7	Nitrato de amonio	50	Nitrógeno
8	Nitrato de amonio calcáreo	50	Nitrógeno, calcio, magnesio
9	Fórmula de finca	100	-