



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS DE GRADO

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO

DE

INGENIERO AGRÓNOMO

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y PATOGENICA DE LAS
POBLACIONES DE *Mycosphaerella fijiensis* EN EL CULTIVO DE PLÁTANO.**

AUTOR

Bernardo Segundo Castro Véliz

DIRECTORA

PhD. Carmen Suarez

QUEVEDO - LOS RÍOS - ECUADOR

2012

FINANCIAMIENTO

**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS, INIAP**

&

IMPROVING LIVES THROUGH BIODIVERSITY RESEARCH





UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Tesis presentada al Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agrarias como requisito previo para la obtención del Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TEMA: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y PATOGÉNICA DE LAS POBLACIONES DE *Mycosphaerella fijiensis* EN EL CULTIVO DE PLÁTANO.

APROBADA:

Ph.D. Carmen Suárez – Capello

DIRECTORA DE TESIS

Ing. Agr. Simón Ampuño

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Agr. M.Sc. Ignacio Sotomayor Herrera

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ing. Agr. Cesar Varas

MIEMBRO DE TRIBUNAL



CERTIFICACIÓN

Ph.D. Carmen Suárez Capello, Docente de la Facultad de Ciencias Agrarias de la **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**, Certifico: Que el egresado: **CASTRO VELIZ BERNARDO SEGUNDO**, realizó las actividades necesarias para la elaboración de la tesis de grado titulada **CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y PATOGENICA DE LAS POBLACIONES DE *Mycosphaerella fijiensis* EN EL CULTIVO DE PLATANO**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ph.D. Carmen Suárez Capello.
DIRECTORA DE TESIS

No se trata de que tú hagas todo perfecto, sino de que te atrevas, a realizarlo. Para eso es necesario unir dos elementos: la lucha y el amor por lo que vas hacer.

ANSELM-GRUN

DEDICATORIA

No existen palabras para describir todo lo que siento al ver realizado este sueño, por lo que quiero dedicar este trabajo:

A “*DIOS*” mil gracias por esta vida.

A mi Madre, por tu esfuerzo y apoyo incondicional, tu eres mi vida e inspiración, te quiero mucho.

A Patterson, Luis, Brigitte y Brithany “mi familia” una de las razones para mi superación profesional gracias por su amor y compañía.

A mis Abuelos(as), Tíos(as), Primos(as), gracias por su apoyo y voz aliento.

A mi sobrinito que está por llegar a este mundo, mil gracias por esta alegría.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

Ph.D. Carmen Suárez Capello, ex Líder del Departamento Nacional de Protección Vegetal, de la EET-Pichilingue del INIAP, a la vez directora de tesis, por haber compartido sus conocimientos y experiencias, que la vida le devuelva de gran manera lo que ha hecho por mí.

A Bioersity Internacional, organismo no gubernamental que financio esta investigación.

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por darme la oportunidad de realizar mi tesis de grado.

A la Facultad de Cencías Agrarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, a través de sus directivos quienes incentivan a los estudiantes hacia el fortalecimiento y desarrollo de nuestras habilidades.

Ing. M.Sc. Ignacio Sotomayor Líder del Programa Nacional de Banano, Plátano y otras Musáceas de la EET-Pichilingue del INIAP y Miembro de mi tribunal de sustentación. Por sus acertados consejos y cambios constructivos al proyecto que desembocaron en el pulimento del mismo.

A los docentes de la escuela de Ingeniería Agronómica que me han brindado su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación durante mi paso por esta ilustre carrera como estudiante.

A todos quienes forman parte del DNPV de la EET-Pichilingue. Ing. M.Sc. Danilo Vera, Ing. M.Sc. Karina Solís, Tec. Sofía Peñaherrera gracias por su amabilidad, disposición y buena voluntad.

A Ing. Juan Agama, Ing. Stalin Revelo y la Sra Lorena Ledesma gracias por su amabilidad.

A los Biólogos Adela Quevedo y Enoy Leiva gracias por sus sabios consejos y amistad.

A Jefferson Zambrano, Jonathan López, Jonathan Espinosa, José Vélez y Denny Carriel, mis amigos por sus preciados consejos y gratos momentos.

Gracias a cada uno de mis compañeros de estudio y amigos en general, por los momentos vividos durante los años de estudio.

A todas y todos quienes de una u otra forma han colocado un granito de arena para el logro de este Trabajo de Grado, agradezco de forma sincera su valiosa colaboración.

**La responsabilidad de la presente
investigación es única y exclusiva del autor.**

BERNARDO CASTRO VELIZ.

ÍNDICE

CONTENIDO

	Páginas
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Justificación	2
B. Objetivos.....	3
1. General.....	3
2. Específico	3
C. Hipótesis	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
A. Generalidades de las Musáceas	4
B. Sigatoka negra	5
1. Clasificación Taxonómica	7
2. Biología y ciclo de vida del patógeno	7
3. Sintomatología.....	10
4. Dispersión de <i>M. fijiensis</i>	13
5. Manejo de la enfermedad	13
C. Resistencia a fungicidas.....	15
D. Variabilidad morfológica y patogénica de <i>M. fijiensis</i>	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
A. Localización del Estudio	20
B. Características Climáticas de la EET-Pichilingue ²	20
C. Factor en Estudio	20
D. Materiales	21
1. Etapa de recolección de muestras	21
2. Etapa de laboratorio.....	21
E. Zonas de Estudio	22
F. Descripción de los cultivares a utilizar	22
1. Williams	22
2. Orito	23
3. Barraganete	23
G. Manejo del Experimento	24

1. Experimento 1. Caracterización cultural y morfológica de 120 cepas de <i>M. fijiensis</i>	24
a. Protocolo para el aislamiento de <i>M. fijiensis</i>	24
b. Variables registradas	25
1) Selección de aislamiento por color y textura.....	26
2) Crecimiento radial del hongo	26
3) Producción y conteo de conidios	26
2. Experimento 2. Inoculación de las 120 cepas de <i>M. fijiensis</i> en fragmentos de hojas en cinco cultivares de <i>Musa</i> spp en condiciones controladas de laboratorio	27
a. Recolección de material vegetal.....	27
b. Preparación de la suspensión conidio micelar.....	28
c. Inoculación	28
d. Variables registradas	28
1) Periodo de Incubación (PI).....	28
2) Tiempo de Evolución de Síntomas (TES)	29
3) Tiempo de Desarrollo de la enfermedad (TDE)	29
H. Análisis Estadístico.....	29
IV. RESULTADOS	31
A. Caracterización Morfológica y patogénica.....	31
1. Colección de aislamientos	31
2. Análisis de Componentes principales.....	31
3. Categorización de Virulencia de las cepas	36
4. Análisis de Correlación	39
V. DISCUSIÓN	40
VI. CONCLUSIONES	42
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. RESUMEN	44
SUMMARY	46
IX. BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE CUADROS

	Paginas
Cuadro 1. Escala de Foure (1985) para la evaluación de resistencia a la Sigatoka negra en doce cultivares de <i>Musa</i> spp inoculadas con <i>M. fijiensis</i> bajo condiciones controladas.....	30
Cuadro 2. Valores propios, proporción de la varianza individual y acumulada en 11 componentes principales de la investigación “ Caracterización morfológica y patogénica de poblaciones de <i>M. fijiensis</i> en el cultivo de plátano ”.....	31
Cuadro 3. Valores propios (eigenvalues) de los primeros 4 componentes principales de la investigación “ Caracterización morfológica y patogénica de poblaciones de <i>M. fijiensis</i> en el cultivo de plátano ”.....	32
Cuadro 4. Categorización de cepas de <i>M. fijiensis</i> en Altamente virulenta (AV), Medianamente virulenta (MV) y Ligeramente virulenta (LV).	37
Cuadro 5. Análisis de Correlación de características morfológicas y patogénicas de la investigación “ Caracterización morfológica y patogénica de poblaciones de <i>M. fijiensis</i> en el cultivo de plátano ”.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Paginas
Figura 1. Ascosporas germinadas de <i>M. fijiensis</i> (reproducción sexual). EET- Pichilingue, INIAP, 2011.....	7
Figura 2. Conidios de <i>M. fijiensis</i> (reproducción asexual). EET- Pichilingue, INIAP, 2011.....	8
Figura 3. Ciclo de vida de <i>M. fijiensis</i> (adaptado de EL Hadrami, 2000).	9
Figura 4. Escala de severidad de infección de la Sigatoka negra, EET- Pichilingue, INIAP- 2011	11
Figura 5. Tonalidades presentes en aislamientos <i>in vitro</i> de <i>M. fijiensis</i> en PDA, procedentes de las zonas de El Carmen y La Mana.	34
Figura 6. Comportamiento de largo de conidios y número de septas en los aislamientos de <i>M. fijiensis</i> , procedentes de la zona de El Carmen y La Mana.	35
Figura 7. Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales considerando los parámetros evaluados largo de conidios, numero de septas y Periodo de incubación-Tiempo de evolución de los síntomas-Tiempo de desarrollo de la enfermedad entre los aislados obtenidos en las zonas de El Carmen y La Mana.	36

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS DEL ÁPENDICE

	Paginas
Cuadro 1. . Formato de evaluación para muestreo en las Zonas de El Carmen y La Mana en los cultivos de <i>Musa</i> spp. EET-Pichilingue, INIAP, 2011.....	61
Cuadro 3. Formato de evaluación de fragmentos inoculados con <i>M. fijiensis</i> . EET-Pichilingue, INIAP, 2011.....	62
Cuadro 5. Localización, origen y huésped de aislamientos de <i>M.fijiensis</i> en las zonas de El Carmen y La Mana. INIAP, 2011	63

ÍNDICE DE FIGURAS DEL ÁPENDICE

	Paginas
Figura 1. . Obtención de Material vegetal y cultivos monosporicos de <i>M. fijiensis</i> . EET-Pichilingue, INIAP, 2011	60

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del plátano es de gran importancia a nivel de pequeños productores, al constituirse en un alimento esencial para la dieta básica y generar ingresos a la canasta familiar. Se cultiva a nivel mundial en un área aproximada de 5 290 107 hectáreas, con una producción anual de 33 349 584 TM, de las cuales el 70% se concentra en los países del África y el restante en las regiones de América Latina y el Caribe (27%) y Asia (3%). En América Latina, Colombia (38%), Perú (19%) y Ecuador (8%) son los países más productores **(FAO 2006)**.

Entre los principales problemas fitosanitarios que enfrenta el cultivo, se encuentran los ocasionados por hongos y nematodos. En el caso de los hongos, la Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es considerada la enfermedad foliar más limitante y destructiva a nivel mundial. Esta enfermedad causa destrucción paulatina del área foliar, afectando el proceso fotosintético, haciendo que la planta llegue a la floración con un reducido número de hojas funcionales, perjudicando el eficiente llenado de frutos y acelerando el proceso de maduración de la fruta, lo que genera grandes pérdidas económicas en la fase de comercialización **(Guzmán 2006; Marín y Romero 1998)**.

La enfermedad actualmente se encuentra presente en todas las regiones productoras de *Musas* del mundo **(Orozco y Aristizabal, 2006)**. Su control se basa principalmente en la aplicación de fungicidas, en Ecuador hasta el 2002 se gastaba más de 60 millones de dólares anuales en fungicidas solo para combatir la Sigatoka negra y esto en algunas regiones represento más del 40% de los costos de producción **(Chang, 2000)**, hecho que está fuera del alcance de la economía de un pequeño productor. En los últimos años se han generado híbridos resistentes a la Sigatoka Negra **(Rowe y Rosales, 1996; Vuylsteke et al., 1997)**, que sin embargo no han tenido buena acogida porque dichos cultivares varían sustancialmente sus características culinarias (caso del plátano) y de sabor (banano), por tanto se requiere

Comentado [D1]: ACTUALIZAR DATOS

continuar en la búsqueda de estrategias que permitan mejorar opciones de control de este patógeno.

El panorama se agrava porque *M. fijiensis* es una variante muy agresiva del género y continua presentando alta adaptabilidad a variaciones ambientales. Por lo tanto, para el manejo de la enfermedad es necesario generar estrategias basadas en el conocimiento de la biología del patógeno y la coevolución con su hospedero (McDonald et al., 1989; McDonald, 1997).

La información sobre el grado de variabilidad patogénica (Fullerton y Olsen, 1995; Romero y Sutton, 1997a), morfológica y genética del hongo en relación con el tipo de hospedero y las características de una región o lugar en particular (Johanson et al., 1994), permite así establecer estrategias de control más eficientes y evitar la pérdida de sensibilidad que ha mostrado el hongo a los fungicidas (Romero y Sutton, 1997b).

El presente estudio dará información más precisa del comportamiento del hongo proveniente de áreas plataneras en el país donde el patosistema *M. fijiensis* – *Musa* tiene más de 25 años establecido. Para lo expuesto anteriormente se requiere los procesos de aislamiento del hongo, desarrollo en medio de cultivo sólido y producción de micelio en medio líquido, seguido de estudios morfológicos y pruebas de patogenicidad, lo que permite ampliar el conocimiento del patógeno y el comportamiento del hospedero en estudio.

A. Justificación

En banano se estima que la aplicación constante de fungicidas provoca la aparición de poblaciones resistentes del hongo a ciertos grupos químicos además de daños al ambiente y a la salud humana; en el caso del plátano, aunque no hay la misma

presión de fungicidas debido a que los productores usan pocos químicos, existe una gama de cultivares (Barraganete, Dominico y Dominico Hartón) creciendo en diversas condiciones ecológicas que también pudieran causar variación adaptativa en el patógeno. En ambas situaciones el conocimiento de la biología y su evolución con los respectivos hospederos permitirá plantear estrategias de control más eficientes.

B. Objetivos

1. General.

- Determinar la presencia de biotipos de *Mycosphaerella fijiensis* asociados a cultivares de musa (AAB) en dos regiones del Ecuador.

2. Específico.

- Establecer las características morfológicas y culturales de diferentes poblaciones del hongo.
- Establecer niveles de agresividad de las diversas colonias de *M. fijiensis* en tres cultivares de *Musa spp.*

C. Hipótesis.

Existe variabilidad entre las poblaciones de *M. fijiensis* colectadas en la región Centro Norte del Litoral, que deben considerarse para los planes de control de Sigatoka negra.

I. REVISION DE LITERATURA

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

A. Generalidades de las ~~Musaceas~~ Musáceas

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) son plantas herbáceas, poliploides y perennes ampliamente adaptadas a regiones tropicales y subtropicales. En la planta se distinguen tres partes importantes: el cormo con hijuelos y el sistema radical, el pseudotallo con el sistema foliar y el racimo o inflorescencia. Dos especies diploides de 22 cromosomas cada una, *Musa*, ~~*acuminata*~~ Colla (genoma A) y *M. balbisiana* Colla (genoma B), son los ancestros comunes de todas las variedades triploides y tetraploides conocidas (Simmonds y Shepherd, 1955; Robinson y Saúco, 2010). El tamaño del genoma de *Musa* fue determinado como 550 Mbp en *M. balbisiana* y 600 Mpb en *M. acuminata* (Lisak *et al.*, 1999). ~~Este es más grande que los genomas de algunas especies como arroz o *Arabidopsis thaliana*, pero más pequeño que algunos cereales como la cebada o el centeno. Los 11 cromosomas que conforman el conjunto haploide son relativamente pequeños y todos tienen un tamaño similar con 50 Mpb de DNA (Osuji *et al.*, 1998).~~

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm, Interlineado: 1.5 líneas, Punto de tabulación: 14.5 cm, Izquierda

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

M. acuminata es una de las especies de banano cultivadas más importante en el mundo en términos de producción y consumo. Este cultivo se cosecha en muchos países en desarrollo en los trópicos, en donde proporciona un alimento básico para gran parte de la población. Se considera un alimento de alto nivel energético, rico en minerales y vitaminas, con un corto periodo de vida media (Manrique *et al.*, 2007; Robinson y Saúco, 2010).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, Negrita, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, Negrita, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm, Interlineado: 1.5 líneas, Punto de tabulación: 14.5 cm, Izquierda

En Ecuador la producción de Musáceas se desarrolla a través de los cultivos de plátano Barraganete (AAB), Dominico (AAB) y Dominico Hartón (AAB) y banano del sub grupo Cavendish tales como Williams (AAA), Valery (AAA), Grand Nain(AAA). El banano Orito (AA) es otra musácea de importancia económica para el país, siendo la zona de La Mana el principal sitio de producción. Se encuentra

sembrado como monocultivo y cultivo mixto combinado con cacao, frutales perennes, y otros cultivos. La zona de El Carmen, provincia de Manabí se destaca por la mayor producción de plátano con 52612 hectáreas aproximadamente de donde sale el 95% de la producción para la exportación con un rendimiento de 5 Tm/Ha; mientras que, la producción de banano ocurre a nivel nacional con una superficie cosechada de 218.793 hectáreas y un rendimiento aproximado de 37,6 Tm/Ha (INEC 2011; MAGAP 2011).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

En Ecuador las exportaciones de banano y plátano han evolucionado positivamente en la última década. La tasa de crecimiento promedio durante el período 2008-2009 ha registrado un crecimiento de 16.4% y 28.8% respectivamente, mientras que de enero a diciembre del 2010 las exportaciones totales entre banano y plátano llegaron a más de 5 millones de toneladas representando un ingreso aproximado de 2.000 millones de dólares por concepto de divisas (MAGAP 2011). A nivel mundial se cosecharon 4,923,584 hectáreas de banano y 5,358,917 de plátano en este mismo año (<http://faostat.fao.org>, consultada el 20 de Julio de 2011).

Comentado [D2]: REVISAR DATOS REFERENTES A ECUADOR

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Negrita, Color de fuente: Negro

En Colombia se cultivaron 43,835 hectáreas de banano de exportación y 30,530 para consumo interno durante el año 2009; 15,156 de plátano para exportación y 335,226 para consumo interno durante el mismo período (www.agronet.gov.co, consultada el 20 de Julio de 2011).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Colombia es el tercer país exportador de banano, el primer productor de plátano de exportación y el segundo productor a nivel mundial lo que refleja la importancia de estos cultivos en la economía y la alimentación (<http://faostat.fao.org>, consultada el 20 de Julio de 2011). A nivel mundial se cosecharon 4,923,584 hectáreas de banano y 5,358,917 de plátano en este mismo año (<http://faostat.fao.org>, consultada el 20 de Julio de 2011).

Comentado [D3]: REVISAR DATOS REFERENTES A ECUADOR

Con formato: Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Justificado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm, Interlineado: sencillo, Punto de tabulación: 14.5 cm, Izquierda

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

B. Sigatoka negra

La Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [anamorfo *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton], es considerada hasta el momento, la enfermedad foliar de mayor importancia que afecta a los cultivos de plátano y banano en todo el mundo, produciendo pérdidas en rendimiento de hasta 100%, si no se implementan medidas para su manejo (Orozco y Aristizábal, 2006).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm, Interlineado: 1.5 líneas, Punto de tabulación: 14.5 cm, Izquierda

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman

La enfermedad provoca desórdenes significativos en el crecimiento vegetativo de la planta, la cual sufre un severo deterioro del área foliar y de la productividad del cultivo, al disminuir su capacidad fotosintética. De presentarse esta condición, la planta no logra extraer de las hojas los elementos nutritivos para llevarlos al racimo y llenarlo; éste puede presentar madurez prematura y la fruta no sirve para la exportación (Herrera, 2007).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro, Español (España)

La Sigatoka negra es producida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (*Peudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, anamorfo). También se conoce como el estriado negro de la hoja y es considerada la enfermedad foliar más destructiva y costosa de los plátanos y bananos a nivel mundial (Carlier et al., 2000, Pasberg Gauh et al., 2000).

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm, Punto de tabulación: 14.5 cm, Izquierda

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

La severidad de este patógeno se magnifica en un sistema agrícola como el de las Musáceas, en el cual la propagación vegetativa (reproducción asexual) y el cultivo en grandes extensiones de tierra de un clon genéticamente uniforme, lo hace altamente vulnerable a ataques epidémicos de la misma (Clay y Kover, 1996).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Por otra parte, la naturaleza compleja de este patógeno le da un gran potencial de adaptación a nuevas condiciones climáticas, a nuevos fungicidas y genotipos hospederos (Ploetz, 2000). Además, los costos de fungicidas químicos son accesibles principalmente para las grandes productoras multinacionales (Hibler y Hardy, 1994). Por ello se plantea convivir con dicha enfermedad, promoviendo el

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

uso de cultivares con algún nivel de resistencia a la Sigatoka negra, una alternativa a evaluar especialmente en sistemas pequeños de producción.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Las evaluaciones en campo bajo condiciones de infección, han sido durante mucho tiempo el único método disponible para evaluar y seleccionar genotipos de *Musa* resistentes a *M. fijiensis* (Chaerani, 2006), las mismas deben estar validadas por comparación de los genotipos de interés con cultivares de referencia en pruebas multilocales (Mourichon, 1997; Carlier et al., 2003). Aunque Pérez et al., (2006) manifiesta la potencialidad del ensayo de fragmentos de hojas como una metodología para comparar la agresividad en un solo ciclo infectivo de diferentes poblaciones de *M. fijiensis* bajo condiciones controladas de inoculación así como para evaluar la reacción de resistencia parcial de clones de *Musa spp.* al patógeno basándose en la velocidad de evolución de las lesiones.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

1. Clasificación Taxonómica

El patógeno *M. fijiensis* tiene la siguiente clasificación (Agrios, 1996).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Reino: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Clase: *Loculoascomycetes*

Orden: *Dothideales*

Familia: *Mycosphaerellaceae*

Género: *Mycosphaerella*

Especie: *Mycosphaerella fijiensis*

2. Biología y ciclo de vida del patógeno

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

M. fijiensis presenta una gran capacidad patogénica y afecta numerosos cultivares de diversos genomas (AA, AAB y ABB). La susceptibilidad del subgrupo de plátano comercial AAB, respecto a otros cultivares ABB, trae consecuencias serias en la producción de este cultivo y en casos extremos, puede llegar hasta la pérdida completa de la cosecha (Mourichon y Fullerton, 1990).



Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Figura.1. Ascosporas germinadas de *M. fijiensis* (reproducción sexual). EET-Pichilingue, INIAP, 2011¹⁰.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

El hongo es heterotático, se caracteriza por presentar dos formas reproductivas claramente diferenciadas en su fase sexual y asexual. Esto último le proporciona una amplia capacidad de infección y mayor plasticidad genética, gracias a la recombinación. Los estados anamórficos y teleomórficos están presentes en las hojas infectadas y las ascosporas son determinantes en el desarrollo de la epidemia (Mourichon y Zapater, 1990).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro, Español (Ecuador)

Este patógeno, se caracteriza por la presencia de 1 a 4 conidióforos simples que emergen de los estomas en forma de estrías jóvenes en el envés de las hojas. Los

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

conidióforos producen conidias (esporas asexuales) que forman un hilum o cicatriz distintiva en la base siendo fácilmente desprendidas por el viento. La principal fuente de inóculo son las ascosporas (esporas sexuales), que pueden propagarse a través del viento a grandes distancias. Los conidios tienen menor impacto, los cuales se forman a partir de los conidióforos, ya sea uno por cada conidioforo o en pequeños grupos compuestos por 4 a 8 conidios. Estos son cilíndricos y pueden estar formados por 1 ó 10 segmentos, aparecen extendidos o curvados con forma obtusa en el ápice y truncados o redondeados en la base. Su longitud puede estar entre las 30 a 132 μm (Stover and Simmonds 1987).



Figura.2. Conidios de *M. fijiensis* (reproducción asexual) EET-Pichilingue, INIAP, 2011.



Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro, Español (Ecuador)

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Figura.1. Forma de reproducción asexual del hongo *M fijiensis*, EET Pichilingue, INIAP, 2010.

Los pseudotecios (peritecios) o cuerpos fructíferos de carácter sexual varían en cuanto a sus características, pero en su mayoría son globulares con un diámetro entre 47 y 85 μm , se observan incrustados en el tejido de la hoja y se pueden visualizar en ambas superficies, aunque son más abundantes en el haz que en el envés. Las paredes del peritecio son de color marrón oscuro y están formadas por tres o cuatro capas de células con forma poligonal. Dentro del peritecio se forman numerosas ascas que son bitunicadas y oclavadas, dentro de estas se forman las ascosporas cuyas dimensiones alcanzan las 12.5 – 16.5 μm x 2.5 – 3.8 μm y son biseladas con la célula predominante unida al asca (Mulder y Holliday, 1974).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

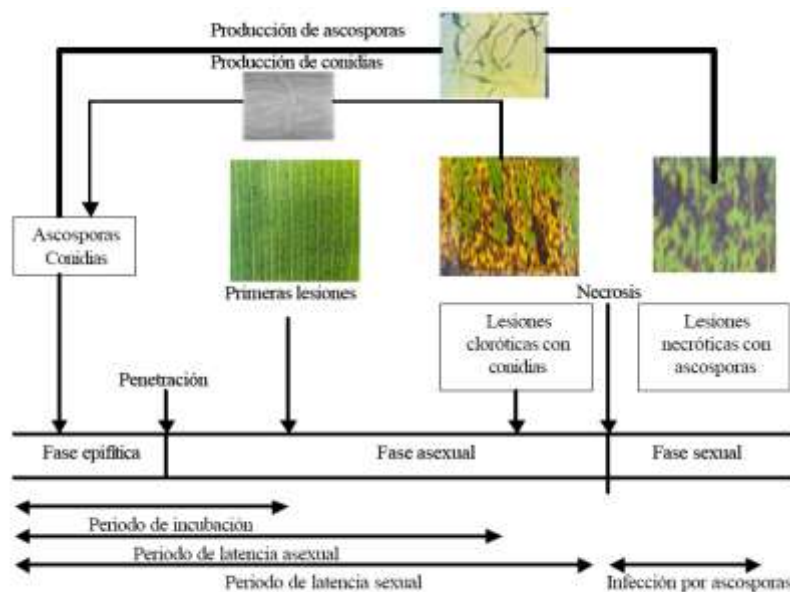


Figura 3. Ciclo de vida de *M. fijiensis* (adaptado de El Hadrami 2000)

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

El ciclo de vida de *M. fijiensis*, se inicia con la germinación de las ascosporas, seguida de la penetración. Ambos procesos requieren de la presencia de una película de agua sobre la superficie de la hoja. La germinación de las esporas se da en aproximadamente 2 horas mediante el desarrollo de los tubos germinativos, los cuales se alargan y ramifican en búsqueda de los estomas, donde penetran y se desarrollan por los espacios intercelulares. La penetración ocurre entre 48 y 72 horas si las condiciones de humedad y temperatura son favorables. La temperatura óptima es próxima a los 26°C. El desarrollo de las primeras lesiones da inicio a la fase asexual, en los estomas aparecen algunos conidióforos, principalmente por el envés de la hoja (Stover, 1983). A los 28 días de la infección aparecen los primeros conidios y a los 49 días finaliza el ciclo cuando se da la liberación de las primeras ascosporas (Merchán, 1998).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

El periodo de incubación, tiempo comprendido entre la infección y la aparición del primer síntoma, está condicionado por las condiciones climáticas y la susceptibilidad del hospedero. En condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, este periodo dura aproximadamente entre 13 y 14 días; mientras que en condiciones desfavorables puede tardar hasta 35 días. Posterior a la penetración, la hifa del hongo coloniza las células adyacentes en no menos de 7 días sin que existan síntomas de la enfermedad o destrucción de células.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

El período de latencia, se define como el tiempo en que tarda el hongo en producir lesiones con presencia de pseudotecios y ascosporas viables. Al igual que en el período de incubación, el período de latencia se ve influenciado por las condiciones climáticas, susceptibilidad del hospedero y la intensidad de la infección. Este período, se encuentra en un rango de 25 días bajo condiciones de alta humedad y 70 días en la temporada seca. Durante la época húmeda, se presenta una alta descarga de ascosporas y un rápido desarrollo de la infección (Marín et al., 2007).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

3. Sintomatología

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Como resultado de la acción patogénica de *M. fijiensis* en las hojas de las plantas afectadas, se manifiestan una serie de síntomas tal y como se observan en la figura 2, que van desde puntos y rayas hasta manchas necróticas, pasando por diferentes estados, los cuales han sido descritos por Fouré (Fouré, 1991), de la siguiente manera:

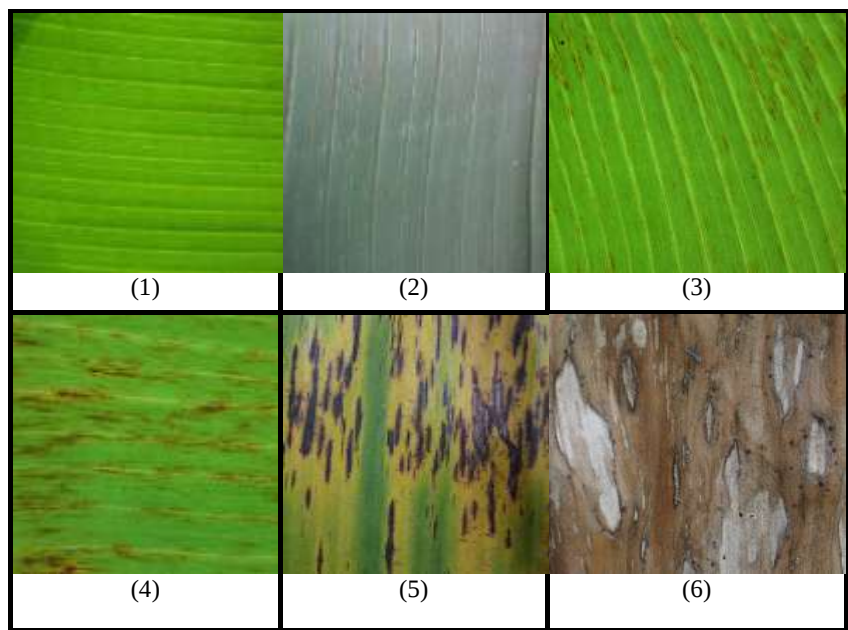


Figura. 4. Escala de severidad de infección de la Sigatoka negra., EET-Pichilingue, INIAP, 2011.

ESTADO 1. Se distingue por la presencia de ligeras decoloraciones o por puntos con menos de un milímetro de longitud, de color café rojizo más conocida como pizca. Este síntoma no es visible al trasluz y solo se puede observar por el envés de la hoja.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

ESTADO 2. Las pizcas aumentan de tamaño en sentido longitudinal paralelas a la venación, formando estrías de 2 a 3 mm de longitud, de color café rojizo, visibles primero en el envés y luego en el haz de las hojas.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

ESTADO 3. Se distingue por la presencia de estrías o rayas con un tamaño mínimo de 5 mm, pudiendo alcanzar hasta 2 a 3 cm de largo. Las estrías conservan el color rojizo por el envés y presentan un tono negro por el haz.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

ESTADO 4. Se caracteriza por la presencia de manchas elípticas u ovals de color café por el envés y negro por el haz.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

ESTADO 5. En este estado la mancha elíptica es totalmente negra en ambas caras de la hoja, aparece rodeada por un halo amarillo y presenta una “depresión” en el centro del tejido.

ESTADO 6. La mancha está totalmente desarrollada; el área central hundida es de color gris y un borde de color café oscuro o negro forma un anillo bien definido alrededor de la mancha. Además, aparece un halo de color amarillo brillante alrededor de la lesión. Aún cuando la hoja esté muerta, la mancha persiste y el anillo oscuro que rodea la mancha también se mantiene bastante definido.

La Sigatoka Negra ataca solamente las hojas, donde las esporas producen una gran cantidad de manchas que coalescen rápidamente, causando necrosis y muerte de toda el área foliar. De esta manera, disminuye la actividad fotosintética afectando el normal crecimiento y productividad de las plantas y trayendo, como consecuencia, la maduración prematura de los racimos, lo que se constituye en la mayor causa de pérdidas ligadas al ataque de esta enfermedad (Merchán, 2000, citado por Bornacelly y Bolaño, 2003).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

4. Dispersión de *M. fijiensis*

Los estudios de población del patógeno han puesto de manifiesto que en el ámbito mundial o en distancias muy largas, la diseminación ocurre a través del movimiento de material vegetal infectado; en otras escalas (continente y/o país (distancias = centena de kilómetros)) la dispersión ocurrirá con el movimiento de material vegetal infectado y por una dispersión limitada de ascosporas; esto explica la importante diferenciación genética observada, resultante de una diseminación estocástica de la enfermedad. Estudios epidemiológicos preliminares sugieren que la distancia media de dispersión de ascosporas a partir de una fuente de inóculo es del orden de una poca cantidad de metros (Abadie et al. 2003)

En el ámbito de un país y de una planta, distancias inferiores a unas pocas centenas de kilómetros, la dispersión por las ascosporas tomará más importancia y resaltará el flujo de genes, base de la diferenciación genética.

5. Manejo de la enfermedad

El método tradicional para el manejo de la Sigatoka negra, ha sido las **prácticas culturales**, dirigida a reducir la fuente de inóculo del patógeno y forma parte de un programa de manejo integrado de la enfermedad. En este sentido, el establecimiento de un buen sistema de drenaje, la remoción de las hojas viejas en el suelo junto con la poda sanitaria, se han utilizado durante años como estrategias para reducir la densidad del inóculo, sin dejar de lado, un adecuado programa de fertilización. Se ha propuesto el establecimiento de altas densidades de siembra, con el fin de generar un

micro y mesoclima al interior de la plantación, creando condiciones desfavorables para el patógeno (Rosales et al. 2002).

El método de **control químico**, más ampliamente utilizado, se establece dentro de un programa normal de rotación entre fungicidas, sistémicos y protectores, a lo largo del ciclo del cultivo. De acuerdo a Marín y Romero (1998), los fungicidas para el control de esta enfermedad se pueden agrupar en tres categorías, con base en su modo de acción: fungicidas de contacto o protectores, de acción sistémica local y fungicidas sistémicos. En cuanto a los fungicidas protectores (Mazoceb y Clorotalonil), estos son utilizados de forma alternada con fungicidas sistémicos (benzimidazoles, azoxistrobina), estos últimos, son aplicados con aceites o emulsiones como adherente (Romero, 2006).

El **mejoramiento genético** como en todo cultivo sería una de las mejores alternativas para el control de la Sigatoka negra. Los híbridos desarrollados por el programa de mejoramiento genético convencional de la Fundación Hondureña de Investigación agrícola (FHIA), fueron distribuidos en más de 50 países alrededor del mundo y están en evaluación desde 1991, mediante el programa internacional de Músaceas patrocinado por INIBAP. Todos los híbridos liberados hasta la fecha, poseen adecuadas características comerciales y resistencia o tolerancia a la enfermedad. Asimismo, poseen un rango adecuado de adaptación agroclimática y con las prácticas agronómicas adecuadas pueden ser aprovechados en su máximo potencial. Estos híbridos han tenido gran éxito en Cuba donde se cultivan cerca de 10,000 Há, principalmente de FHIA-18 y recientemente FHIA-21. En los últimos 10 años, se iniciaron otros programas internacionales de mejoramiento genético convencional en Brasil, Camerún y Guadalupe, orientados hacia el desarrollo de variedades resistentes a la Sigatoka negra (Rosales y Pocasangre, 2002).

En la búsqueda de nuevas alternativas para el control de la Sigatoka negra, se tienen algunas aproximaciones en el **control biológico**, tendiente a reducir el inóculo de la

enfermedad, utilizando microorganismos, que en buena medida actuarían como antagonistas o competidores contra *M. fijiensis* (Patiño et al. 2006; Guzmán 2006; Talavera et al. 1998; Gutiérrez 1996; González et al. 1996). A pesar de los avances, el empleo de estos microorganismos y el cómo hacerlos eficientes para uso masivo, está aún poco desarrollado, máxime que una de las limitantes en su aplicación es la efectividad disminuida causada por el efecto negativo de factores ambientales, los cuales pueden alterar la supervivencia, actividad y vida útil de estos en la superficie de la hoja.

En la última década, se ha sugerido el uso de hongos endofíticos, epífitos, micorrizicos, y/o rizobacterias con gran capacidad para la producción de sustancias que promueven el crecimiento, como las auxinas y citoquininas, entre otras (Orozco - Santos y Orozco-Romero, 2006). Asimismo, en otros patosistemas que causan enfermedades foliares, se han identificado bacterias transformadoras de minerales, compuestos orgánicos en forma disponibles a la planta como solubilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno libre. Estos atributos se traducen en vigor a la planta y como consecuencia le otorgan resistencia a patógenos (Benítez et al. 2004; Harman et al. 2004; Howell 2003; Yedidia et al. 2001; Arora et al. 1992).

Complementando lo expuesto anteriormente, Vera et al. (2004), manifiesta que un adecuado control de la enfermedad puede ser logrado mediante el uso de técnicas de manejo integrado, siendo visibles estas diferencias en el primer año de aplicación y acentuándose en los siguientes años, teniendo claro que el paquete de manejo de la Sigatoka negra recomendado para el cultivo de banano en Ecuador, no se adapta al cultivo de plátano por lo que este precisa recomendaciones de manera individual.

C. Resistencia a fungicidas

La aparición repentina de la resistencia en una población de patógeno puede, cuando no se reconoce en una etapa temprana, tener como resultado el fracaso del control de la enfermedad y consecuentemente graves pérdidas de la cosecha, Dekker (1982) define a la resistencia a un fungicida como el cambio hereditario de una célula fungosa o una población de un hongo a un fungicida, lo que resulta en una sensibilidad menor de lo normal hacia éste.

El uso comercial de un mismo fungicida durante algunos años, puede generar poblaciones de patógenos que no son lo suficientemente sensibles para ser controlados adecuadamente. Ellos aparecen generalmente, como una respuesta al uso repetitivo del fungicida o al uso de otros fungicidas químicamente relacionados y/o con un mecanismo bioquímico de acción fúngico similar. Las poblaciones del patógeno que desarrollan la resistencia a un fungicida pueden llegar a ser simultáneamente y automáticamente resistentes a otros fungicidas que son afectados por la misma mutación del gen siguiendo el mismo mecanismo de la resistencia (Brent, 1995). Igualmente, se señala que con la introducción de los fungicidas sistémicos, la incidencia de la resistencia creció y el tiempo de aparición de esta es a menudo relativamente corto, 2–3 años después de la primera aplicación, con la agravante de que esta resistencia es heredable.

D. Variabilidad morfológica y patogénica de *M. fijiensis*

Manzo et al., (2001) caracterizaron la morfología de *M. fijiensis* de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios líquidos. En los resultados se observó que el diámetro máximo fue 6, 3 mm a los 14 días en el medio de cultivo PDA. Las colonias mostraron color de gris-oscuro a blanco-rosado, forma esférica o con zonas irregulares y una consistencia algodonosa o compacta. El peso seco de micelio en medio líquido a los 15 días después de la siembra, fue mayor en caldo V8 (0,64 mg), seguido por extracto de malta (0.35mg), Czapek (0.27 mg), levadura peptona (0.26mg), nutrientes sintéticos (0,15 mg) y papa dextrosa (0,11mg). Todo

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

esto indica que las características morfológicas de los aislamientos de *M. fijiensis* varían entre huertos de plátano de diferente lugar y que la producción de micelio se optimiza en caldo V8.

Algo diferente realizó **Manzo (2001)** quien muestreó plantaciones con diferente grado de manejo de las cuales obtuvo 20 aislamientos monospóricos de *M. fijiensis*, siete de ellos fueron aislamientos procedentes de cultivos con manejo intensivo, 8 de semi intensivo y 5 de rústicos, los cuales difirieron en color, forma y apariencia de las colonias. Con esto demuestra la influencia de actividades como frecuencia de deshoje y deshije y el número de aplicaciones fúngicas anuales y fertilización, etc. Los análisis genéticos correspondientes demostraron un elevado nivel de flujo de genes entre las localidades analizadas y los resultados muestran que el nivel de tecnificación influye en la diversidad genética del hongo. La variación morfológica de los diversos aislamientos son similares a las descritas por **Sánchez et al., (2001)**.

En cambio **Donzelli y Churchill (2007)**, realizaron una comparación de la virulencia de 4 cepas (CIRAD 743 y 301 cepas de tipo salvaje y los mutantes espontáneos de las dos cepas anteriores 743Pink y 301W2.2) con micelio fragmentado y cuatro concentraciones como inóculo en plantas de banano Grande Naine (AAA), que son altamente susceptibles a *M. fijiensis*. Las pruebas resultaron en el desarrollo del tejido necrótico localizada en cada zona de la inoculación en 3 de las cepas puestas a prueba (743, 301 y 301W2.2) mientras que áreas inoculadas con la cepa Colar 743Pink nunca desarrollaron lesiones típicas de Sigatoka negra en ninguno de los ensayos, demostrando que existe variación en la virulencia de las cepas.

A si mismo **Pérez et al., (2006)** constataron la existencia de diferencias de agresividad entre aislados de *M. fijiensis* procedentes de plantas de FHIA 18 de campos severamente afectados por la enfermedad y los obtenidos de plantas

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Cavendish de zonas libres de clones con resistencia parcial. Las diferencias en campo son sin embargo mayores que las observadas en los ensayos en fragmentos de hojas. Los resultados indican por primera vez la selección de poblaciones de *M. fijiensis* con agresividad sobre el clon FHIA 18 con resistencia parcial en esta localidad, posiblemente por presión de selección direccional (**Mather, 1953; Whole, 1982**) debido a la extensión de la superficie cultivada de este genotipo y a las condiciones desfavorables de nutrición que han prevalecido en los últimos años en la mayoría de las áreas bananeras del país. Resultados similares fueron obtenidos por **Leiva et al., (2002)** quienes al evaluar la agresividad de dos cepas de *M. fijiensis* (cepas I1 y G1) en el cv. Gran Naine, en condiciones de invernadero, se demostró que la cepa I1 es más agresiva, pues los primeros síntomas aparecieron a los 12 días, en contraste con la otra cepa G1 con la que se observó la aparición de los primeros síntomas a los 16 días después de la inoculación. **Busogoro et al., (1999)** obtuvieron resultados similares mediante la infección de *M. fijiensis* (cepa I1) sobre hojas separadas de diferentes cultivares de *Musa* spp, y establecidas en un medio de cultivo sólido de supervivencia.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Hasta el presente, la selección de poblaciones más agresivas de *M. fijiensis* sobre clones con resistencia parcial no se había documentado, y esto debe de tenerse en cuenta en los programas de mejoramiento de musáceas actuales. El patógeno muestra una importante capacidad de variación y adaptabilidad, como lo ha demostrado la selección de poblaciones resistentes a Triazoles en Cuba y otros países y a diferentes genes de resistencia de los clones con resistencia parcial de la FHIA desplegados en la empresa La Cuba. **Fullerton y Olsen (1995)** por su parte señalan que un mejor entendimiento tanto de las estructuras de las poblaciones del patógeno así como su evolución es clave para la asistencia a los programas de mejoramiento de bananos y de manejos de la enfermedad.

La variabilidad patógena de *M. fijiensis* fue demostrada por **Fullerton y Olsen (1995)**, quienes utilizaron sesenta y seis aislados obtenidos de diferentes hospederos de *Musa* procedentes de diferentes países y localidades productoras. Este estudio

demostró que algunas cepas que son virulentas sobre un hospedero no lo fueron sobre otro. Algunos hospederos fueron susceptibles prácticamente a todas las cepas, mientras otros como T8 y Calcutta, fueron resistentes a algunos aislados pero susceptibles a otros. Las cepas de Papua Nueva Guinea y de las Islas del Pacífico, mostraron un amplio rango de diversidad patogénica sobre los cultivares comúnmente usados como fuente de resistencia de programas de mejoramiento como Calcutta, Paka y Pisang Lilin.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

Otro de los estudios sobre la variabilidad patógena lo realizaron **Romero y Sutton (1997)**, quienes evaluaron la reacción de dos híbridos, FHIA 1 y FHIA 2, con resistencia y dos cultivares altamente susceptibles, enano gigante y falso cuerno, a *M. fijiensis*, determinaron su reacción con diferentes aislados del hongo y a tres temperaturas (22, 26 y 30 °C). Se concluyó que los híbridos mostraron resistencia a todos los aislados y en las tres temperaturas, provocando mayor daño a 26 °C, tal y como se ha reportado como la temperatura para el desarrollo óptimo de la enfermedad en genotipos susceptibles de *Musa* (**Stover, 1983; Jacome y Schuh, 1992**).

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

En el país Vera (2003) evaluó la variabilidad de aislados ecuatorianos de *M. fijiensis* y demostró que basándose en el análisis de todos los componentes, no hay evidencia de la especificidad del huésped entre los aislamientos de *M. fijiensis* ecuatorianas. Sin embargo, la agresividad varió entre los aislados. Se concluyó que la inoculación artificial de *M. fijiensis* en plántulas se puede utilizar en la evaluación de componentes de resistencia a enfermedades de diferentes genotipos de *Musa* sp. al patógeno. Este es el primer estudio de los componentes de la agresividad de *M. fijiensis*, lo que proporciona una ayuda a los futuros programas de mejoramiento para obtener resistencia contra el patógeno.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro

En estudios recientes realizados por **Cuellar et al., (2011)** se encontraron diferencias en la morfología y virulencia de 50 aislamientos de *M. fijiensis* inoculados en

plántulas de plátano Dominico Hartón. La virulencia de los aislamientos no se relacionó con su origen geográfico ni con el genotipo del cual se obtuvieron. Los genotipos de plátano y banano mostraron un comportamiento diferencial frente a cinco aislamientos, lo cual indica la presencia de razas del patógeno. Los genotipos Topocho, Maqueño, FHIA 20, FHIA 21 de plátano y los genotipos Sedita y FHIA 23 de banano presentaron un mayor nivel de resistencia.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Localización.

La presente investigación se llevó a cabo en el Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV), de la ESTACIÓN EXPERIMENTAL TROPICAL PICHILINGUE, del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, ubicado en la Provincia de los Ríos en el Km. 5 vía Quevedo – El Empalme, situada entre las coordenadas geográficas 1° 05' Latitud Sur 79°26 Longitud Occidental¹.

B. Características climáticas.

El clima en la zona es tipo tropical húmedo, se encuentra a una altura promedio de 75 msnm, con una textura del suelo franco arcillosa, temperatura media anual de 24,8°C, precipitación promedio anual de 2148 mm, humedad relativa media de 83%, heliofanía 830, 32 horas promedio anual².

C. Factor de estudio.

El factor en estudio fue la agresividad de poblaciones de *M. fijiensis* colectadas en las zonas de El Carmen y La Mana.

Fuente: Estación del INAMHI.

(*) Valores promedios registrados desde 1994 a 2009 en la Estación Meteorológica Pichilingue del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI).

D. **Materiales.**

En el presente estudio se requirieron diversos materiales, herramientas, equipos, insumos y reactivos, los mismos que se detallan a continuación:

1. Etapa de recolección de muestras:

- Podón y poladera
- Machete
- Tijera
- Fundas plásticas
- Etiquetas
- Bolígrafo
- Hielera
- Matrices de registro de fincas
- Tablero
- GPS
- Mechero
- Papel aluminio
- Matraces
- Algodón
- Marcadores
- Probetas
- Mortero y pistilo
- Porta y cubre objetos
- Hematocímetro
- Agitadores
- Libro de campo
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas 100 µL

2. Etapa de laboratorio:

- Fundas plásticas
- Tijeras
- Papel toalla
- Papel filtro
- Grapadora y grapas
- Cajas petri
- Tubos de ensayo
- Asa fina
- Vasos de precipitación
- Espátula
- Taras
- Jabón
- Fósforos
- Cinta transparente
- Laminas de bisturí
- Alcohol
- Agar
- Carbonato de calcio
- V8
- PDA
- Cloranfenicol
- Agua destilada
- Hojas de plátano afectadas con Sigatoka negra

- Fragmentos foliares de 3 x 3 cm.
- Tween 20
- Gelatina
- Balanza gramera
- Microondas
- Refrigeradora
- Incubadora
- Estufa
- Autoclave
- Microscopio
- Estereoscopio
- Cámara de flujo laminar
- Contador manual
- Cámara de fotos digital
- Agitador calentador magnético
- Peachímetro
- Vortex

E. Zonas de estudio

Para el presente trabajo se muestrearán 120 fincas de pequeños productores de plátano, provenientes de dos zonas: 60 fincas en La Mana (Cotopaxi) y 60 en El Carmen (Manabí), respectivamente. En cada finca se recolectaron muestras foliares que según la escala de Fouré (1985) presentaban el estadio 6 de sigatoka negra de y se transportaron al laboratorio para continuar con análisis.

F. Descripción de los cultivares utilizados

Para efectos del presente estudio, se usaron 3 cultivares, dos triploides y un diploide, de alto valor comercial y variada respuesta al hongo, los cuales se describen a continuación.

Williams: Este cultivar pertenece al subgrupo Cavendish AAA, actualmente la producción mundial de banano está sustentada en los cultivares de este subgrupo. Tiene una gran distribución tanto a escala mundial como nacional. Se cultiva a todo lo largo y ancho del Ecuador bajo diferentes sistemas de producción. Dentro de los principales mercados de la fruta de este cultivar están la Unión Europea, EEUU y Rusia. Presenta alta producción y

calidad en el fruto que produce, posee un porte realmente bajo alcanzando una altura promedio de 1.8 y 2.0 m de altura, medido a un metro de la superficie del suelo al momento de la aparición de su inflorescencia. Tiene un amplio sistema radical que le da mayor resistencia al volcamiento causado por vientos. Se destaca por su mayor adaptabilidad a condiciones extremas de clima, suelo y agua; siendo su mayor inconveniente una alta susceptibilidad frente a los nemátodos y a la Sigatoka negra (**López, 2011**).

Orito: Es el único diploide con genoma AA utilizado en el presente estudio. Este cultivar se encuentra distribuido en todas las regiones naturales del Ecuador (Costa, Sierra y Oriente). En algunas zonas se lo conoce también como “almendra”. El pseudotallo es de color amarillo verdoso con abundantes manchas castaño-oscuros. Es un cultivar de poco vigor aunque puede alcanzar más de 4 metros de altura. La planta soporta muy bien la acción del viento, debido a su eficiente sistema radical. Los racimos son pequeños y compactos, tienen la forma de cilindro pudiendo llegar a tener de 6 a 11 manos por racimo y entre 107 a 286 dedos de pequeño tamaño, gruesos y redondeados, a la madurez toman un color amarillo limón. La pulpa es ligeramente amarilla, suave, pastosa, dulce y con mucho aroma cuando madura. El ciclo de siembra a cosecha varía de 8.4 a 9.7 meses (**López, 2011; Fernández, 2006**).

Barraganete. Es un triplode (AAB) cuya altura va de 3, 15 - 3,35 metros. Su color es verde claro sin tonalidades rojizas en los bordes de las vainas foliares; presenta una moderada resistencia a Sigatoka negra pero una susceptibilidad frente a los nematodos (**Belalcazar et al. 1991; Narvaez, 2004**). En Ecuador la zona de El Carmen es la principal productora de este cultivar destinando en casi su totalidad a la exportación.

G. Manejo del experimento

La investigación estuvo conformada por dos experimentos los mismos que se realizaron bajo condiciones controladas en laboratorio (*in vitro*). El primer ensayo, consistió en la obtención de poblaciones del patógeno, las cuales fueron caracterizadas de forma cultural y morfológica. En el segundo experimento se realizaron inoculaciones artificiales de las 120 cepas de *M. fijiensis* sobre 3 cultivares de *Musa* spp, en donde se evaluó la agresividad de las mismas mediante la reacción de los cultivares frente al ataque del patógeno.

Previo a la instalación de los experimentos, se realizó ajustes a las metodologías a utilizar, tales como: tiempo de descargas de esporas, medio de cultivo para el crecimiento y esporulación del hongo; además, se planteó una metodología para alargar la vida verde de los fragmentos de hojas, con el objetivo de permitir la reproducción sexual del patógeno en las manchas.

1. EXPERIMENTO 1. Caracterización cultural y morfológica de 120 cepas de *M. fijiensis*.

a. Protocolo para el aislamiento de *M. fijiensis*.

Para el aislamiento del patógeno, se siguió la técnica descrita por Stover (1976), para lo cual se recolectó tejido foliar afectado por sigatoka negra en el estadio 6 según la escala de Fouré (1985), debido a que en ese estado se presentan manchas con gran cantidad de pseudotecios. En el laboratorio se seleccionaron áreas foliares que presentaron la mayor cantidad de pseudotecios, se lavaron con agua destilada estéril y se ubicaron por 48 horas dentro de fundas plásticas con papel toalla humedecido para simular una cámara húmeda y homogenizar la maduración de los pseudotecios.

Seguidamente, se cortaron fragmentos de 2 x 2 cm del material afectado, los cuales fueron grapados en discos de papel filtro de 10 cm de diámetro. El disco se sumergió en agua destilada estéril por 10 minutos. Con papel toalla se les quitó el exceso de agua y se los colocó dentro de las tapas de las cajas petrí, de tal forma que el haz de los fragmentos quede expuesto al agar-agua (20 g/L) contenido en la caja base. En estas condiciones se los mantuvo unos 30 minutos para que descarguen las ascosporas. Con un marcador permanente se delimitó el área de descarga, y con el lente de 10 x del microscopio se verificó la presencia de ascosporas en dichas áreas. Luego se incubaron por 1 hora a 26 °C, para estimular la germinación de las ascosporas.

Como lo indica Stover (1976), las ascosporas germinadas se capturaron una a una con la ayuda de una aguja fina, y se transfirieron a un medio agar V8 (200 ml de jugo V8, 3 g CaCO₃, 800 ml de agua, 15 g de Agar, pH 6.0), en donde se las mantuvieron en incubación a 26 °C por 3 días, en condiciones de total oscuridad (Barcos, 2009). Transcurrido este tiempo, las colonias visibles se transfirieron a otra caja petrí que contenía 20 ml de medio sólido PDA (35g/L de PDA deshidratado, Difco), los que se mantuvieron en incubación a 26 °C durante 21 días. En el transcurso de tiempo se evaluará la formación de la colonia a los 7, 14 y 21 días.

b. Variables registradas.

Las 120 colonias del hongo que se obtuvieron se evaluaron en base a características morfológicas, como color y borde de las colonias, tipo de micelio (textura) y velocidad de crecimiento.

(1). Selección de aislamiento por color y textura.

De las 60 muestras obtenidas en cada una de las zonas evaluadas, se eligió crecimientos del hongo *M. fijiensis* de acuerdo a las características morfológicas diversas que se presentaron, basadas éstas en las observaciones por semana de color, textura y borde de la colonia.

(2). Crecimiento radial del hongo.

El crecimiento radial de cada uno de los aislamientos se evaluó en cajas Petri con medio PDA, mantenidas a 27°C.

Las mediciones del crecimiento de *M. fijiensis* fueron registradas semanalmente durante 21 días, tiempo en que el hongo alcanzó su crecimiento máximo en la caja Petri. Esta variable se registró, con la ayuda de un calibrador y fue expresada en milímetros.

(3). Producción y conteo de conidios.

Debido a la baja o casi nula producción de conidios característica de *M. fijiensis* in vitro, los aislamientos fueron inducidos a esporulación, mediante el siguiente proceso: la colonia de 30 días de crecimiento fue colocada en un tubo con 3ml de agua Tween (50µl de Tween 20/100 ml de agua), y sometida durante 5 minutos a agitación en un Vortex con el fin de desprender **ufc** (unidades formadoras de colonias). Con una Micropipeta se colectaron 300 µl de esta suspensión y se asperjó sobre la superficie de una caja petri que contenía 20 ml de medio V8. Finalmente se sellaron las cajas de Petri e incubaron a 25 °C ±1 con 12 horas de luz y oscuridad durante 21 días, para estimular la esporulación conidial.

La producción de conidios fue utilizada para el estudio de la patogenicidad de los 120 aislamientos. Su proceso se realizó en medio sólido después de 21 días de crecimiento de los aislamientos inducidos para la esporulación, de los cuales se preparó una solución en agua destilada estéril más Tween 20. Esta fue asperjada sobre la caja con crecimiento activo y con un bisturí se raspó su superficie, la cual fue sometida a Vortex durante 5 minutos y se determinó el número de conidios en la suspensión. Este conteo se realizó con la ayuda de una cámara de Neubauer donde se colocó 1 ml de la solución conidial y se determinó la concentración de cada una de las muestras, las que se utilizaron para el proceso de inoculación.

2. EXPERIMENTO 2. Inoculación de 120 cepas de *M. fijiensis* en fragmentos de hojas de cinco cultivares de *Musa* spp en condiciones controladas de laboratorio.

Para el presente estudio, se siguió la metodología propuesta por diversos autores, y la desarrollada y estandarizada en el laboratorio de Fitopatología del Departamento Nacional de Protección Vegetal de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP.

(a). Recolección del material vegetal

Se recortaron fragmentos de la segunda hoja completamente expandida de 4 x 4 cm, procedentes de vitroplantas de 8 semanas de edad. Los fragmentos se lavaron con agua destilada estéril y jabón, los que después se sumergieron en cloro al 10% por 1 minuto. Transcurrido ese tiempo, se les realizó un triple lavado con agua estéril, se escurrió el agua de los fragmentos y se los colocó en una solución (1 L de agua + 1mg de ácido giberélico + 1 g de ácido cítrico) durante 5 minutos. Luego los fragmentos se depositaron en cajas de Petri que contenían 20 ml de medio semilíquido (agua + 2 g de agar/L), tomando en cuenta que el haz del fragmento quede en contacto con el medio de tal forma que el envés del

fragmento quede expuesto para poder realizar la inoculación, tal como lo describe **Pérez et al (2006)**.

(b). Preparación de la suspensión conidio miceliar

Para la prueba de patogenicidad se utilizaron las poblaciones de *M. fijiensis* recolectadas en el primer experimento y correspondientes a las dos zonas de estudio. Se utilizó la solución que se preparó en el primer ensayo para medir la concentración de conidios, la que fue sometida vigorosamente a movimiento con el agitador eléctrico (Vortex) y se las filtró a través de 2 capas de gaza para remover fragmentos grandes de micelio. La concentración se determinó con un Hemacitómetro y se ajustó a 10000 ufc/ml. Finalmente se le agrega a la suspensión gelatina al 1 % para que se adhiera mejor a los fragmentos en el momento de la inoculación.

(c). Inoculación

Con la ayuda de una micro pipeta graduada se colocó 100 µL de la suspensión conidio / miceliar sobre la superficie del envés del fragmento de hoja. Con un pincel esterilizado se dispersó uniformemente la suspensión sobre todo el fragmento. Después de la inoculación se colocaron las cajas petri en una incubadora a 26 °C; durante dos horas al día se les aplicó luz fluorescente constante, hasta completar todas las observaciones.

(d). Variables registradas

1). Periodo de Incubación (PI): Se determinó el número de días transcurridos desde el momento de la inoculación hasta la aparición del primer síntoma (E1 pizcas).

2). Tiempo de Evolución de Síntomas (TES): Este comprendió el número de días transcurridos desde la aparición del estado **E1** hasta el **E6**;

3). Tiempo de Desarrollo de la enfermedad (TDE): Representó el número de días desde el momento de la inoculación hasta la aparición de las primeras manchas en **E6**. Estas variables se determinaron de acuerdo a la escala descrita por Fouré (1985) (**Cuadro 1**).

H. Análisis Estadísticos

Para caracterizar los diferentes aislamientos de *M. fijiensis* procedentes de las áreas estudiadas, se utilizaron métodos de estadística multivariada, tales como Análisis de Conglomerado, Componentes Principales y Regresión Polinómica. Para determinar si existen diferencias significativas entre los parámetros evaluados, se realizó el análisis de varianza (ANOVA). Previo a ello se realizaron las pruebas de normalidad (Kolmogorov Smirnov) y la homogeneidad de varianzas (Levene). Para ello, se utilizó el Software INFOSTAT, versión Estudiantil.

Cuadro 1. Escala de Fouré (1985) para la evaluación de resistencia a la Sigatoka negra en doce cultivares de *Musa spp*, inoculadas con *M. fijiensis* bajo condiciones controladas.

E1 = Corresponde a una pequeña decoloración aproximadamente 1 mm de largo, clorótica o amarilla en la fase inicial y visible únicamente en el envés de la hoja. Para observarla, debe exponerse el envés de la hoja a la luz, ya que al trasluz no puede determinarse.

E2 = La decoloración se convierte en una estría de 2-3 mm de largo, pudiendo ésta ser observada tanto en el envés como en el haz de la hoja. A esta fase se le denomina comúnmente “pizca”.

E3 = La estría aumenta sus dimensiones haciéndose más larga y más ancha. Es a partir de esta fase cuando aparecen los conidióforos los cuales dan lugar a la producción de conidios.

E4 = Este se presenta como una mancha oval que toma una coloración marrón o pardo oscuro en el envés y negra en el haz de la hoja.

E5 = Se caracteriza por ser una mancha totalmente negra con tendencia elíptica y rodeada por un halo amarillo cuyo centro empieza a deprimirse.

E6 = Si el desarrollo de la enfermedad llega a alcanzar esta fase, el centro de la mancha se seca y llega a ser blanco-grisáceo, en el que pueden apreciarse claramente la presencia de pseudotecios.

VI. Resultados

A. Caracterización Morfológica y Patogénica.

1. Colección de aislamientos de *M. fijiensis*. Del procesamiento de las muestras foliares afectadas con síntomas típicos de la enfermedad de la Sigatoka negra, se conformó una colección de 120 aislamientos monospóricos de *M. fijiensis* de las cuales la información de su procedencia y hospedero se encuentran en el anexo 4.

2. Análisis de Componentes Principales (ACP)

La variabilidad del presente trabajo experimental es explicada en términos de porcentajes por la proporción de variación individual y acumulada de un total de 11 Componentes Principales (CP) que son presentados en el Cuadro 2. En este sentido, la proporción individual es el aporte que cada CP realiza para explicar la variabilidad del experimento. De esto se desprende que los CP más explicativos son los CP1 y CP2 con 22 % y 19 %, respectivamente. Cada uno de los restantes CP explicó de forma decreciente porcentajes de la variabilidad existente, la cual estuvo entre el 5; 2 y 1 % desde el CP3 hasta el CP9

Cuadro 2. Valores propios, proporción de la varianza individual y acumulada en 11 componentes principales de la investigación “**Caracterización morfológica y patogénica de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* en el cultivo de plátano**”.

Variable	Valor	Proporción	Prop Acum
1	2,4	0,22	0,22
2	2,12	0,19	0,41
3	1,5	0,14	0,55
4	1,24	0,11	0,66
5	1,04	0,09	0,75
6	0,94	0,09	0,84
7	0,74	0,07	0,91
8	0,57	0,05	0,96
9	0,45	0,04	1
10	0	0	1
11	0	0	1

Por su parte, la proporción acumulada es la sumatoria realizada entre la proporción individual explicada por cada CP. Así pues, en el Cuadro 3, con 4 CP se explica más del 66 % de la variabilidad existente en el presente trabajo experimental y con 8 CP una proporción acumulada del 96 por ciento.

Cuadro 3. Valores propios (eigenvalues) de los primeros 4 componentes principales de la investigación “Caracterización morfológica y patogénica de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* en el cultivo de plátano”.

Variables	e1	e2	e3	e4
	-			
C R	0,02	0,2	0,09	-0,54
L C	0,06	-0,11	-0,03	0,63
N S	0,08	-0,12	0,29	0,42
CL21D	0,18	-0,06	0,36	-0,21
	-			
PI O	0,26	0,19	0,45	-0,02
PI B	0,15	0,48	-0,39	0,16
TES B	0,4	0,14	0,52	0,04
TDE B	0,44	0,43	0,19	0,13
PI W	0,25	0,4	-0,26	-0,06
TES W	0,41	-0,48	-0,07	-0,13
TDE W	0,53	-0,27	-0,2	-0,15

e1-4: Valores propios (eigenvalues) de los cuatros primeros componentes principales; Cr: crecimiento radial; LC; Largo de conidios; NS: Número de septas; CL21D: Coloración a los 21 días; PIO: Periodo de incubación cultivar orito; PIB: Periodo de incubación cultivar Barraganete; PIW: Periodo de incubación cultivar Williams; TESB: Tiempo de evolución de síntomas en cultivar Barraganete, TESW: Tiempo de evolución de síntomas en cultivar Williams, TDEB: Tiempo de desarrollo de la enfermedad en cultivar Barraganete, TDEW: Tiempo de desarrollo de la enfermedad en cultivar Williams.

Con la finalidad de precisar las variables más importantes dentro de cada CP se presentan los valores propios con que cada variable aporta para la explicación de la variación existente en los 4 primeros CP que como se presentó en el Cuadro 2, son los más informativos de este experimento. Con este fin, en el Cuadro 3, se puede observar que en el CP1 que explica el mayor porcentaje de la variación de este trabajo, las variables más importantes son Tiempo de desarrollo de enfermedad en Cultivar “Williams” (0,53),

Tiempo de desarrollo de enfermedad en Cultivar “Barraganete”(0,44) y Tiempo de evolución de síntomas en Cultivar “Barraganete ” (0,4), lo que significa que el CP1 explicó mayoritariamente las variables relacionadas con la agresividad de las cepas antes los cultivares evaluados, donde se desarrollo con éxito la evolución de los estadios de la enfermedad, mientras que con el Cultivar Orito solo se pudo calcular el Periodo de incubación debido a que solo llego hasta el estadio tres de desarrollo de la enfermedad con todas las cepas evaluadas.

En el CP2 el periodo de incubación del cultivar barraganete (0,48) y tiempo desarrollo en cultivar barraganete (0,43) y Periodo de incubación de cultivar Williams (0,4), fueron las de mayor poder explicativo en este componente.

Por su parte, nuevamente las variables que explican la agresividad de las cepas, Tiempo de evolución de los síntomas en cultivar Barraganete (0,52) y Periodo de incubación en cultivar Orito (0,45), fueron las de mayor nivel explicativo en el CP3.

Mientras que la mayoría de las variables morfométricas y morfológicas son explicadas por el CP4, pues se observa que el largo de conidios (0,63), Numero de septas (0,42), obtuvieron los valores más altos en este Componente.

En más detalle con el largo de conidios y número de septas, se obtuvieron aislados con cierta diferencia. Los aislados 2MC8, 3MC23, 3MCB Y M-13,1, presentaron los menores valores en largo de conidias el numero de septas fluctuó entre 2 a 10 unidades, en la Figura 6. observamos el agrupamiento de los aislados que produjeron conidios, 40 pertenecientes de la zona de El Carmen y 24 de la zona de La Mana de donde con el primer componente se explica el 55,5% de la variabilidad.

Con respecto al color de la colonia, este varió a través de los 21 días del experimento, el cual inicialmente fue grisáceo (100%) para todas las cepas procedentes de la zona de La Mana, a los 14 días las tonalidades (Figura 5) difirieron de gris blancuzca, blanco rosácea, y grisácea (43,55%, 20% y 33,67% respectivamente) y a los 21 días vario de blanco grisácea, blancuzca, blanco rosácea y grisácea (56,6%, 5%, 1,67% y 36,67%), en lo que respecta a la zona de El Carmen inicialmente también presento la tonalidad grisácea (100%), a

los 14 días presento 4 tonalidades, blanco grisáceo, grisáceo, blanco rosáceo, rosáceo (50%, 18,33%, 20% y 11,67% respectivamente) y a los 21 días las tonalidades variaron de blancuzca, blanco rosácea, grisácea y blanco grisácea (8,33%, 26,67%, 6,67% y 58,33%), en crecimiento radial los valores oscilaron para la zona de El Carmen de 6,12 a 7,39 mm y para la zona de La Mana de 5,16 y 9,65, siendo los aislamientos procedentes de la primera zona más grandes, pero en tonalidades la segunda zona presento mas variabilidad en la Figura 6. se muestran el agrupamiento de los aislados en base al crecimiento y su coloración a los 21 días, en donde con el CP1 se explica el 66,2% de la variabilidad.



Figura 5. Tonalidades presentes en aislamientos *in vitro* de cepas de *M. fijiensis* en PDA, procedentes de las zonas de El Carmen y La Mana.

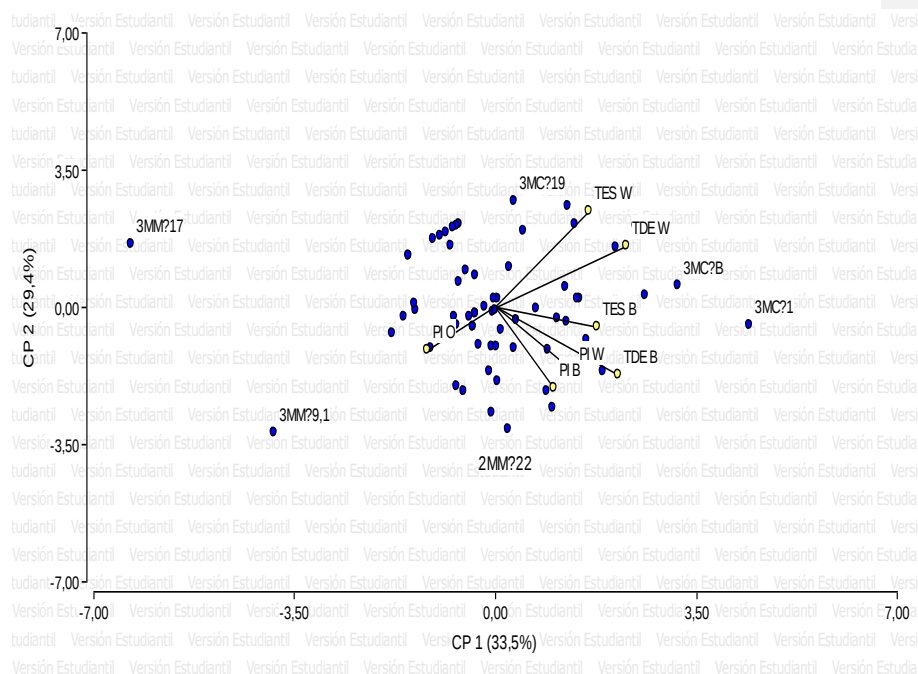


Figura 7. Biplot obtenido del Análisis de Componentes Principales considerando los parámetros evaluados largo de conidios, numero de septas y Periodo de incubación-Tiempo de evolución de los síntomas-Tiempo de desarrollo de la enfermedad entre los aislados obtenidos en las zonas de El Carmen y La Mana.

3. Categorización de Virulencia de las cepas.

En el Cuadro 6, se ha categorizado a las cepas tomando la respuestas de los cultivares Barraganete (AAB) y Williams (AAA) al Tiempo de desarrollo de la enfermedad (TDE), tomando como base las medias (**x**) y la desviación estándar (**S**).

Todos los aislamientos presentaron un comportamiento diferencial ante los tres genotipos evaluados. Por lo observado, la virulencia de las cepas, no parece estar en función de su lugar de origen debido a que de una misma zona se encontró cepas avirulentas, ligeramente

virulentas, moderadamente virulentas y alta mente virulenta, posiblemente este factor esta mas bien relacionado con la capacidad reproductiva del hongo y la presión que ejerce el clima en las zonas estudiadas. Las reacciones observadas de los dos genotipos (Williams y Barraganete) a las diferentes cepas del patógeno, indican que la diversidad genética de los genotipos de *Musa* spp. existentes en la zona parecen ser suficientes para mantener todavía algunos niveles de resistencia.

Cuadro 4. Categorización de cepas de *M. fijiensis* en Altamente virulenta (AV), Medianamente virulenta (MV) y Ligeramente virulenta (LV).

Códigos	TDEB	Categoría	Códigos	TDEW	Categoría
2MC-8	33,33	LV	3MC-1	29,67	LV
3MC-1	33,00	LV	3MC-12	28,33	LV
3MC-18	33,00	LV	3MC-B	28,33	LV
3MC-B	32,67	LV	3MC-13	28,00	LV
MC-6	32,00	LV	3MC-20	28,00	LV
MC-7	32,00	LV	3MC-B2	28,00	LV
2MC-13	32,00	LV	2MC-13	27,00	LV
2MM-17,3	32,00	LV	3MC-18	27,00	LV
2MM-22	32,00	LV	3MC-19	27,00	LV
3MC-15	31,67	LV	M-*	27,00	LV
2MM-19,1	31,67	LV	2MM-17	27,00	LV
3MC-20	31,00	LV	3MM-7,3	27,00	LV
2MM-8	31,00	LV	2MC-20	26,67	LV
3MM-1	31,00	LV	M-12,3	26,67	LV
2MM-12	30,67	LV	3MM-10	26,67	LV
MC-2,1	30,33	MV	2MC-11	26,00	MV
MC-8	30,33	MV	2MC-15	26,00	MV
MC-11	30,33	MV	2MC-18	26,00	MV
MC-D*	30,33	MV	2MC-19	26,00	MV
2MC-2	30,33	MV	2MC-23	26,00	MV
M-12,3	30,33	MV	2MC-25	26,00	MV
2MM-17	30,33	MV	3MC-3	26,00	MV
3MM-4	30,33	MV	3MC-15	26,00	MV
MC-12	30,00	MV	3MC-22	26,00	MV
MC-12B	30,00	MV	3MC-23	26,00	MV
MC-F	30,00	MV	2MM-7	26,00	MV
2MC-3,1	30,00	MV	2MM-18,3	25,33	MV

2MC-4,1	30,00	MV	MC-2,1	25,00	AV
2MC-6,1	30,00	MV	MC-7	25,00	AV
2MC-20	30,00	MV	MC-8	25,00	AV
3MC-13	30,00	MV	MC-11	25,00	AV
M-*	30,00	MV	MC-D*	25,00	AV
3MC-C	29,67	MV	2MC-2	25,00	AV
M-13,1	29,67	MV	2MC-4	25,00	AV
M-14,1	29,67	MV	3MC-5,1	25,00	AV
2MM-7	29,67	MV	3MC-20,1	25,00	AV
2MM-23	29,67	MV	M-10	25,00	AV
2MC-4	29,33	AV	M-14	25,00	AV
3MC-B2	29,00	AV	M-13,1	24,67	AV
M-14	29,00	AV	2MM-19,1	24,67	AV
2MM-18,3	29,00	AV	2MM-23	24,67	AV
3MM-7,3	29,00	AV	MC-12	24,33	AV
3MM-10	29,00	AV	MC-12B	24,33	AV
3MC-20,1	28,67	AV	MC-F	24,33	AV
M-11,2	28,67	AV	2MC-3,1	24,33	AV
M-6	28,67	AV	2MC-4,1	24,33	AV
2MC-9	28,33	AV	2MC-6,1	24,33	AV
3MC-D*	28,33	AV	2MC-8	24,33	AV
2MC-25	28,00	AV	2MC-9	24,33	AV
3MC-12	28,00	AV	3MC-D*	24,00	AV
M-10	28,00	AV	3MC-C	24,00	AV
M-4,1	28,00	AV	M-6	24,00	AV
3MC-5,1	27,67	AV	2MM-8	24,00	AV
3MC-19	27,67	AV	2MM-22	24,00	AV
3MM-9,1	27,33	AV	MC-6	23,67	AV
2MC-11	26,00	AV	2MM-12	23,67	AV
2MC-15	26,00	AV	3MM-4	23,67	AV
2MC-18	26,00	AV	2MM-17,3	23,33	AV
2MC-19	26,00	AV	M-11,2	23,00	AV
2MC-23	26,00	AV	M-14,1	23,00	AV
3MC-3	26,00	AV	M-4,1	23,00	AV
3MC-22	26,00	AV	3MM-1	22,67	AV
3MC-23	26,00	AV	3MM-17	20,67	AV
3MM-17	20,67	AV	3MM-9,1	19,67	AV
X±S (0,488)	X=29,38 S= 2,21			X=25,21 S=1,75	

4. Análisis de Correlación.

En el Cuadro 5. se muestra la matriz de coeficientes de correlación de Pearson (C.C.) entre las variables morfológicas y patogénicas evaluadas en las 120 cepas de *M. fijiensis*. de las zonas El Carmen y La Mana.

Las correlaciones positivas más altas se presentaron entre las variables: Numero de septas (NS) y Periodo de incubación en cultivar Orito (PIO) con un C.C. de 0,96; seguidos por el Periodo de incubación en cultivar barraganete y Tiempo de desarrollo de la enfermedad en cultivar Williams (TDEW) con un C.C. de 0,92; y Largo de conidios (LC) con Número de septas (NS) con un C.C. de 0,91.

Cuadro 5. Análisis de Correlación de característica morfológicas y patogénicas de la investigación “Caracterización morfológica y patogénica de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* en el cultivo de plátano”.

VARIABLES	L C	N S	PI B	TES B	TDE B	PI O	PI W	TES W	TDE W
L C	1	0,91	0,88	0,3	0,33	0,31	0,21	0,36	0,83
N S	0,01	1	0,74	0,34	0,56	0,96	0,72	1	0,83
PI B	0,01	-0,02	1	0,03	0	0,15	7,00E-10	1,20E-03	0,92
TES B	0,08	0,07	-0,16	1	0	0,21	0,83	0,01	3,70E-03
TDE B	0,07	0,04	0,55	0,74	1	0,94	1,90E-05	0,87	0,01
PI O	-0,07	3,40E-03	-0,1	0,09	0,01	1	0,42	3,20E-05	3,60E-06
PI W	-0,09	-0,03	0,43	0,02	0,3	-0,06	1	9,90E-05	6,30E-05
TES W	0,07	-4,20E-04	-0,23	0,2	0,01	-0,3	-0,28	1	0
TDE W	0,02	-0,02	0,01	0,21	0,18	-0,33	0,28	0,84	1

V. DISCUSIÓN

Los resultados de la caracterización morfológica de los aislamientos, mostraron rangos en longitud y número de septas de los conidios que concuerdan con los indicados en la literatura para la identificación del hongo (Ploetz et al., 1994; Jiménez, 2008). En cuanto a las características de diámetro y color y, coinciden con los informes previos de Manzo et al. (2001), Jiménez (2008), Romero (2008) y Cuellar, et al (2011) para aislamientos de *M. fijiensis*.

En la caracterización patogénica de aislamientos, la reacción observada de Orito (AA) ante los 120 aislamientos evaluados (Anexo 5), infiere que todas las interacciones planta-patógeno son de carácter incompatible, ya que 53,33 % de los aislamientos tuvieron una compatibilidad mas bien baja y un 46,67 % nula, lo que demuestra que este genotipo posee genes de resistencia a las poblaciones Ecuatorianas de *M. fijiensis*, o también que las poblaciones ecuatorianas no son lo suficientemente virulentas para romper la misma. Esto se correlaciona con la reacción de resistencia de este genotipo en campo y umbráculo observada por Cedeno (2010) en Ecuador, por otra parte Foure (1985) reporto también como tolerante a un diploide acuminata, llamado Figue Sucree (AA).

Esta investigación, muestra que la estructura poblacional del hongo es muy variable ya que la virulencia de las cepas de *M. fijiensis* en los cultivares Orito, Barraganete y Williams aparentemente no guardan asociación con su origen geográfico, ni con el hospedero del cual fueron aisladas. Encontrándose en un mismo lugar, aislamientos de alta, baja y nula virulencia. Pero también se presentaron aislamientos de diferente agresividad provenientes de un mismo genotipo. Lo que se correlaciona con la alta diversidad genética encontrada en aislamientos de *M. fijiensis* obtenidos en una misma plantación e incluso entre aislamientos de una misma planta (Rivas et al., 2004). Esto se asocia con la reproducción sexual y ciclo de vida corto del patógeno, que provoca un elevado índice de recombinación genética (Manzo et al., 2005), y conlleva a una rápida aparición de poblaciones del hongo con nuevos genes de virulencia (Donzelli y Churchill, 2007).

Las reacciones observadas en los cultivares evaluados con las diferentes cepas del patógeno, indican la alta diversidad genética de los genotipos de *Musa* spp. y evidencian la alta variabilidad en la virulencia de *M. fijiensis*, ya que todos los aislamientos presentaron comportamiento diferencial ante el material vegetal evaluados. Esto coincide con lo planteado por Fullerton y Olsen (1995) quienes utilizaron 63 aislamientos del patógeno, obtenidos de diferentes hospedantes de plátanos y bananos procedentes de países productores de Asia y América; en donde una vez inoculados los aislamientos, se demostraron diferencias en su virulencia y en el progreso de la enfermedad en los 20 genotipos estudiados.

La alta variabilidad patogénica del *M. fijiensis* en los cultivares evaluados demuestra la necesidad de evaluar diferentes genotipos de *Musa* spp. frente a una diversa y amplia gama de aislamientos del hongo que representen su variación patogénica y genética real, que permita reconocer genotipos resistentes a las cepas del país, y a su vez, facilite la identificación de fuentes de resistencia confiables y duraderas a la Sigatoka negra.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación permiten concluir:

En el estudio morfológico de las colonias de *M. fijiensis*, se encontraron diversas tonalidades y velocidades de crecimiento.

Las tonalidades de color observados en cada uno de los aislamientos de *M. fijiensis* variaron según los días de crecimiento; sin embargo, no debe considerarse como un parámetro para diferenciar fenotipos entre los aislados ya que este género reporta una gran variabilidad morfológica para esta característica.

Los aislamientos de *M. fijiensis* presentaron variaciones en el tamaño que evidencian de alguna manera heterogeneidad entre los aislamientos.

No existió relación entre el crecimiento de las colonias y la patogenicidad para la mayoría de los aislados; sin embargo, existieron aislamientos que presentaron una aparente relación.

El aislamiento 3MM-17 fue uno de los que presentaron mayor agresividad a en los cultivares evaluados.

La virulencia de los aislamientos de *M. fijiensis* aparentemente no se relaciono con su origen geográfico ni con el genotipo del cual se obtuvieron.

El método de evaluación temprana es confiable y reproducible, este representa un ahorro en tiempo y recursos en comparación a las pruebas hechas en campo.

VII. RECOMENDACIONES

Debido a la ausencia de resultados sobre caracterización morfológica y fisiológica de *M. fijiensis* en el país, el presente trabajo es una parte importante del estudio de las poblaciones del hongo en diferentes áreas, por lo cual se recomienda continuar y profundizar estas investigaciones con un mayor número de aislamientos procedentes de todas las zonas donde se cultiva plátano y banano (principales variedades cultivadas).

Realizar pruebas con las cepas más virulentas para identificar fuentes de resistencia locales.

Realizar pruebas de caracterización molecular que permitan identificar si existen variaciones genéticas entre los aislamientos obtenidos.

VIII. RESUMEN

La Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* variante muy agresiva de género es la enfermedad foliar mas limitante y destructiva a nivel mundial en los cultivos de banano y plátano en el mundo, esto debido a su gran potencial de adaptación a nuevas condiciones climaticas, a nuevos fungicidas y genotipos hospederos, por lo que llega a producir perdidas en rendimiento de hasta el 100%, si no se aplican medidas para su manejo, siendo el manejo integrado la herramienta clave para su manejo, de lo que se desprende la necesidad de información sobre el grado de variabilidad patogénica, morfológica y genética del hongo para establecer estrategias de control más eficientes basadas en el conocimiento de la biología del patógeno y la coevolución con su hospedero y así evitar la pérdida de sensibilidad que ha mostrado el hongo a los fungicidas. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de biotipos de *M. fijiensis* asociados a cultivares de musa (AAB) en dos regiones del Ecuador a nivel de laboratorio. Los aislamientos se colectaron en zonas de El Carmen (provincia de Manabí) principal zona platanera y La Mana (provincia de Cotopaxi) principal zona oritera, muestreando 60 fincas por zona. El primer ensayo consistió en la obtención de poblaciones del patógeno la cuales fueron caracterizados morfológica y culturalmente. En el segundo experimento se realizaron inoculaciones artificiales de las 120 cepas de *M. fijiensis* sobre los cultivares Orito (AA), Barraganete (AAB) y Williams (AAA), en donde se evaluó la agresividad de las mismas mediante la reacción de los cultivares para lo cual se recolectaron fragmentos de hojas de 3 x 3 cm de la segunda hoja completamente expandida procedentes de vitroplantas aclimatadas de 12 semanas de edad , Los fragmentos se lavaron con agua destilada estéril y jabón, los que después se sumergieron en cloro al 10% por 1 minuto, luego se les realizo un triple lavado con agua estéril y fueron colocados en una solución (1 L de agua + 1mg de ácido giberelico + 1 g de ácido cítrico) durante 5 minutos. Luego los fragmentos se depositaron en cajas petri que contengan 20 ml de medio semilíquido (agua + 2 g de agar/L). Estos fragmentos se inocularon con una concentración de 1000 ufc/mL de las 120 cepas de *M. fijiensis* obtenidos de cultivos en medio V8 de 21 días de edad. Y se midieron las variables Periodo de Incubación (**PI**), Tiempo de Evolución de los Síntomas (**TES**) y el Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (**TDE**), de acuerdo a la escala descrita por Fouré en 1985. Se utilizo estadística multivarida y de acuerdo a las medias y a la

desviación estándar de la variable Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (**TDE**), se categorizó a las cepas en Altamente virulenta, Medianamente virulentas y Ligeramente virulentas. Estas categorías se las obtuvo mediante el intervalo de $\bar{X} \pm S$ (0,4881). Los cultivares mostraron un comportamiento distinto ante las diversas cepas. El cultivar Orito (AA) no evolucionó más del estadio 3, con los cultivares Williams y Barraganete se formó categorías en donde se observó el comportamiento distinto de las cepas, resaltando como la más virulenta la cepa 3MM-17 entre otras. Esta información permitirá usar las cepas más virulentas para encontrar fuentes de resistencia a cepas ecuatorianas.

IV. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Agrios, G. 1996.** Fitopatología. 2 ed. México, LIMUSA. 838 p.
- Abadie C; Elhadrami A; Fouré E and Carlier J. 2003.** Efficiency and durability of partial resistance against black leaf streak disease. In: Jacome L; Lepoivre P; Marín D; Ortiz R; Romero R; Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica: INIBAP, Montpellier, FR.: 161-168.
- Arora DK, Elander RP, Mukerji KG (eds). 1992.** Handbook of applied mycology. Fungal Biotechnology, Vol Marcel Dekker, New York.
- Benítez, T; Rincón, A; Limón, M. and Codón, A. 2004.** Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. Revista International Micribiology. Vol. 7. Genetics of Departament, University of Sevilla, Spain. 249-260 p.
- Bornacelly, H; Bolaño, J. 2003.** Efecto de diferentes labores de manejo sobre el desarrollo de la Sigatoka negra del banano en el distrito de Sevilla, zona bananera del Magdalena. Santa Marta. 311 p. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo). Universidad del Magdalena. Facultad de ingeniería. Área fitopatología.
- Barcos, M. 2009.** Determinación de la influencia de calcio, cobre y boro en el desarrollo de plantas micropropagadas de banano variedad Williams, e inoculadas con conidias y concentrado crudo tóxico de *Mycosphaerella fijiensis*. Tesis M.Sc. Guayaquil, EC. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. 78 p.
- Brent, K. 1995.** Fungicide resistance in crops pathogens: how can it be managed? St Raphael, Norton Lane, United Kingdom. 48 p.

Busogro, JP.; Etame, G.; Lognay, P.; Lepoivre, P. 1999. Selection for banana resistance to Black Leaf Streak disease. Infomusa 8(2):15.

Carlier, J; De-Waele D; Escalant JV. 2003. Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos. Evaluación del comportamiento (A. Vézina y C. Picq, eds). Guías técnicas INIBAP 7. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.

Carlier, J; De Waele D; Escalant JV. 2002. Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium* enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos. Guías técnicas INIBAP 6. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, INIBAP. Montpellier.

Clay, K; Kover, P. 1996. Evolution and stasis in plant pathogen associations. Ecology 77:997-1003.

Chaerani, R. 2006. Early blight resistance in tomato: screening and genetic study Ph.D. thesis, Wageningen University, the Netherlands ISBN: 90-8504-355-7. 88p.

Chang, J, 2000. Efectos de la dolarización en el costo de producción de banano en el Ecuador. ACORBAT – Ecuador. 6pp

Cuéllar, A; Álvarez, E y Castaño, J. 2011. Evaluación de Resistencia de Genotipos de Plátano y Banano a la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet.). Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin 64(1): 5853-5865.

Dekker, J. 1982. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: Center for Agricultural Publishing and documentation, 1982. p. 1–15.

- Donzelli, B. G. G; Churchill, A. C. L. 2007.** A quantitative assay using mycelial fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. *Phytopathology* 97:916-929.
- El Hadrami, A. 2000.** Caractérisation de la résistance partielle des bananiers á la maladie des raices noires et évaluation de la variabilité de L'agent causal, *Mycosphaerella fijiensis*. Thèse d' Université. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Belgique. 13p.
- FAO. 2006.** Base de datos estadísticos (en línea). Consultado 14 sep. 2006. Disponible en <http://apps.fao.org/>.
- Fernández, A. 2006.** Cultivo del Banano en el Ecuador. Cultivo, Plagas y Enfermedades. 2 ed. Machala, EC. GRAFIRAM. 292 p.
- Fouré, E. 1991.** Les Cercosporiosis des bananiers et des plantains au Cameroun, *Mycosphaerella fijiensis* et *M. musicola*: amélioration des stratégies de lutte intégrée par des études épidémiologiques et la lutte génétique. Centre Régional Bananiers et Plantains. Cameroun. En: Biological and Integrated Control of Highland Banana and Plantain Pests and Diseases. Gold and Gemmill Ed. Cotonou, Benin. 290 – 304 p.
- Fullerton, RA; Olsen, TL. 1995.** Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black sigatoka in banana and plantain. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 23:39-48.
- González, R; Bustamente, E; Shannon, P; Okumoto, S and Leandro, G. 1996.** Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. *Revista Manejo Integrado de Plagas*, (CATIE), Costa Rica: 40: 12-16.

- Gutiérrez, CFA. 1996.** Estudio de factores en la inducción de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* y promoción de crecimiento en plantas de banano Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, CR, 91 p.
- Gúzman, M. 2006.** Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 83-91
- Harman, G; Howell, C; Viterbo, A; Chet, I. and Lorito, M. 2004.** Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. Vol 2. 43-56 p.
- Herrera, M. 2007.** Manejo y control de la Sigatoka negra en plátano y banano. Asociación de Ingenieros Agronomos del Valle de Cauca. Revista ASIAVA 77: 12-15.
- Hibler, M. and Hardy, D. 1994.** Breeding a better banana. IDRC: Resources: Book: Reports: Vol.22, No.1. 6 p.
- Howell, C. 2003.** Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease. Vol 87, No. 1. 4-10 p.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) 2010.** Toda la información estadística en un solo sitio Web (en línea) Quito, EC Consultado 9 sep. 2010 Disponible en: <http://www.ecuadorencifras.com/cifras-inec/main.html>

- Jacome, L; Schuh, W. 1992.** Effects of leaf wetness duration and temperatura on Development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *Difformis*. Phytopathology, 82: 515-520.
- Johanson, A; Crowhurst, R.N; Rikkerin, E.H.A; Fullerton, R.A; Templeton, M.D. 1994.** The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. Plant Pathology 43:701-707.
- Leiva M, Dita M, Alvarado Y, Acosta M, García L, Bermúdez I. 2002.** Empleo de diferentes inóculos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de invernadero para evluar el comportamiento de dos cultivares de banano. INFOMUSA vol. 11 no. 2: 41-42
- Lysák M, Dolezelová E, Swennen R, Dolezel, J. 1999.** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in Musa. TAG Theoretical and Applied Genetics 98, no. 8. 1344-1350.
- Lopez, J. 2011.** Comportamiento de diez cultivares de *Musa* spp. frente al ataque de *Radopholus similis*. Tesis Ing. Agr. Quevedo, EC, Universidad Estatal de Quevedo. UTEQ. 80 p.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) 2011.** Estadísticas Agropecuarias principales cultivos del Ecuador serie histórica 2000 – 2010 (en línea) Quito, EC Consultado 10 abril 2011 Disponible en: http://www.magap.gob.ec/sigagro/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=414

- Manrique S M, Ramirez A.C, Ibarra E, Gomez M. A. 2007.** Identification of genes differentially expressed during ripening of banana. En: J. Plant Physiol. 164: 1037-1050.
- Manzo, G. 2001.** Diversidad de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plátano Enano gigante (*Musa acuminata* AAA) cultivado con diferente manejo. Tesis M.Sc. Colima, MX, 95p.
- Manzo, G. 2001.** Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacifico-Centro de Mexico y su desarrollo en medios líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología 19:66-71.
- Marín, D; Romero, R. 1998.** El combate de la Sigatoka negra. En: Divulgación científica al servicio del productor bananero nacional. Dirección de investigaciones de CORBANA. Sandoval, JA; Vargas, R. (eds.). 251 p.
- Marin, D; Romero, R; Guzmán, M; Sutton, T. 2003.** Black Sigatoka and increasing threat to banana cultivation. plant disease V. 87. No. 3
- McDonald, B. A; McDermott, J. M; Goodwin, S. B. and Allard, R. W. 1989.** The population biology of host-pathogen interactions. Annual Review of Phytopathology 27:77-94.
- McDonald, B.A. 1997.** The population genetics of fungi: tolos and techniques. Phytopathology 87: 448-453.

- Merchán V, VM. 1998.** Manejo de problemas fitosanitarios del cultivo del plátano en la zona central cafetera. Seminario internacional sobre la producción de plátano, Armenia, Colombia. 177-191p.
- Merchán, Víctor M. E. 2000.** Prevención y manejo de la Sigatoka negra. Boletín Divulgativo. ICA Ed. No2. Manizales. p. 4-11.
- Mourichon, X and Fullerton, RA. 1990.** Geographical distribution of two species *Mycosphaerella musicola* Leach. (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease and Black Leaf Streak Disease in bananas and plantains. Fruits: 45: 213- 18p.
- Mourichon, X. et Zapater, M. F. 1990.** Obtention in vitro du stade *Mycosphaerella fijiensis*, forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. Fruits 45 (6): 553 – 557p
- Mourichon, X. 1997.** *Mycosphaerella fijiensis*, Diversity and Possibilities for the early screening of germplasm for resistance. En: Jones, D (ed) The improvement and testing of *Musa*: A global partner ship. First Global conference of the international Musa testing program, La Lima, Honduras. Pp 47- 53.
- Mulder, J. L; Holliday, P. 1974.** *Mycosphaerella fijiensis*. CMI. Descriptions of Pathogenic Fungi and bacteria. No. 413.
- Narváez, A. 2004.** Evaluación agronómica y de la resistencia a fitonemátodos, sigatoka negra de cultivares mejorados de banano y plátano en Ecuador. Tesis M.Sc. Turrialba, CR, CATIE 91 p.
- Orozco-Santos, M; Orozco-Romero, J; Farias-Larios, J. 1996.** Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) of bananas in the Pacific Central Coast of Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 14: 48-50.

- Orozco, M. L y Aristabal, M. 2006.** Manejo de las sigatokas del plátano (*Musa AAB*) y su relación con el clima. Universidad de Caldas. Departamento de Fitotecnia. Resumen de investigación. Boletín Fitotecnia No. 110.
- Orozco-Santos M, Orozco-Romero J. 2006.** Manejo sustentable de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano: conocimiento del patosistema, prácticas culturales y control químico. Memorias de la XVII Reunión ACORBAT 2006. Joinville, SC, Brasil. pp. 100-116.
- Patiño, LF; Salazar, LM; Collazos, JC; Piedrahita, RA; Bustamante, E. 2006.** Bacterias liticas y sustratos en la filosfera de banano y plátano para el control de Sigatoka negra. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 133-140 Piñol, M. 2001. Relaciones entre el
- Pasberg-Gauhl, C; Gauhl, F; Jones, D. (2000).** Fungal diseases of foliage. Sigatoka leaf spots. Black leaf streak, distribution and economic importance. En: Jones, D (Ed.) Disease of Banana, Abacá and Enset, pp. 37-44. CAB International, Wallingford
- Pérez, M.; Pérez, L.; Trujillo, R.; Betancourt, D:** “Variabilidad de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Estabilidad de la Resistencia a Sigatoka negra de los clones híbridos de la FHIA”, Fitosanidad, 2006.
- Pérez, L.; Pérez, M.; Jiménez, M.; Jama, M. 2006.** “Ensayo en fragmentos de hojas de bananos y plátanos (*Musa ssp.*) para el estudio a nivel mono cíclico de la evolución de los síntomas de la Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet”, Fitosanidad.

- Ploetz, R. 2000.** La enfermedad más importante del banano y el plátano: Una breve introducción a la historia, importancia y manejo de la sigatoka negra. **In:** Memorias Reunión ACORBAT 2000. Mesa redonda Sigatoka negra. p. 117.
- Robinson Jc and Sauco, V. 2010.** Crop production Science in Horticulture Series, Bananas and Plantains, 2nd Edition. *Design*. La Laguna, Tenerife, Spain: CAB International; ISBN-13: 978 1845936587.
- Romero, RA. 2006.** Caracterización y manejo de la resistencia a fungicidas de *Mycosphaerella fijiensis* en bananos. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.92-99
- Romero, R. R; Sutton, T. B. 1997a.** Reaction of four genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. Plant Disease. 81:1139-1142.
- Romero, R. R; Sutton, T. B. 1997b.** Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of banana, to propiconazole. Phytopathology, 87:96-100.
- Rosales, F; Belalcázar, S; Riveros, AS. 2002.** plantain production in Latin America: A new profitable and sustainable technology. Global conference on banana and plantain. 28 de septiembre- 21 de Octubre. Banglore India. 37p.
- Rosales, F; Pocasangre, L. 2002.** Mejoramiento Convencional de Banano y Plátano: estrategias y logros. Acorbat. Cartagena, Colombia.

- Rowe, P; Rosales, F.E. 1996.** Bananas and Plantain. In: Fruit Breeding. Vol. 1. Tree and Tropical Fruits. J. Janick and j. Moore, New York, John Wiley. Pp. 1667-211.
- Simmonds, N. W and Shepherd, K. 1955.** Taxonomy and origins of cultivated bananas. Journal of the Linnean Society of London Botany; 55:302-312.
- Stover, R.H. 1983.** Effet du *Cercospora* noir sur les plantains en Amérique Centrale. Fruits, 38: 326-329.
- Stover, R; Simmonds, N. 1987.** Bananas(Third edition), Longman Scientific and Tecnichal. New York, USA. 468p.
- Talavera, M; Bustamante, E.; González, R. y Sánchez, V. 1998.** Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismo glucanolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*. Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. No. 47. 24-30 p.
- Vera, D. 2003.** Epidemiologia comparativa de Sigatoka Negra em Bananeiras e Bananeira- da-terra no Equator. M. Sc. Thesis. Universidade Federal de Viçosa.
- Vera, D; Suarez, C; Belezaca, C. 2004.** Estrategias de Manejo Integrado de la Sigatoka negra en Plátano cv. "Barraganete" (*Musa* AAB) en el Ecuador. *In* Memorias de la XVI Reunion International ACORBAT 2004. Oaxaca, Mx. 170 - 173
- Vuylsteke, D; Ortiz, R; Ferris, R. S. B; Crouch, J. H. 1997.** Plantain improvement. Plant Breeding Reviews 14: 267-320.

Yedidia, I; Srivastva, A; Kapulnik, Y. y Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant Soil. 235-242 p.

ANEXOS

Anexo 1. Obtención de Material vegetal y cultivos monosporicos de *M. fijiensis*



Anexo 2. Formato de evaluación para muestreo en las Zonas de El Carmen y La Mana

UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA AGRONOMICA

INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP).DEPARTAMENTO DE SANIDAD VEGETAL-
AREA DE FITOPATOLOGIA

TEMA: Caracterización morfológica y patogénica de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* en el cultivo de plátano

Asunto: Recolección de muestras (Hojas de plátano) infectadas por Sigatoka negra.

Lugar:.....Fecha de recolección:.....# de muestra:.....

# SUBMUESTRA	Área	Coordenadas		CULTIVAR (VARIEDAD)	TIPO DE CULTIVO			MANEJO			CULTIVO ADY	T DE SUELO
		S	W		MNCTV	ASOC	OTROS	NING	MEDIO	TECN		

OBSERVACIONES:.....

.....TAMAÑO DE PLANTACION:.....EDAD:.....

HISTORIA DEL PROBLEMA.....

FORMATO DE EVALUACION

INOCULACION DE FRAGMENTOS DE HOJAS INOCULADOS CON *M. FIJIENSIS* (ZONA EL CARMEN)

CODIGO:			CULTIVAR:				FECHA DE INOCULACION:	
FRAGMENTO	ESTADIOS						OBSERVACIONES	
	E1	E2	E3	E4	E5	E6		
1								
2								
3								

CODIGO:			CULTIVAR:				FECHA DE INOCULACION:	
FRAGMENTO	ESTADIOS						OBSERVACIONES	
	E1	E2	E3	E4	E5	E6		
1								
2								
3								

CODIGO:			CULTIVAR:				FECHA DE INOCULACION:	
FRAGMENTO	ESTADIOS						OBSERVACIONES	
	E1	E2	E3	E4	E5	E6		
1								
2								
3								

Anexo 4. Localización, origen y huésped de aislamientos de *M.fijiensis* en las zonas de El Carmen y La Mana.

ZONA: LA MANA

CODIGO	LUGAR	COORDENADAS		CULTIVAR HOSPEDERO
		S	W	
M-1,1	PUCAYACU	00° 43' 16,1"	79° 07' 28,7"	BARRAGANETE
M-3,1	VILLA VERDE	00° 43' 41,6"	79° 07' 43,4"	BARRAGANETE
M-4,1	VILLA VERDE	00° 43' 41,6"	79° 07' 43,4"	DOMINICO COMÚN
M-6	VILLA VERDE	00° 44' 13,4"	79° 08' 0,29"	DOMINICO
M-10	VILLA VERDE	00° 44' 26,3"	79° 08' 17,0"	BARRAGANETE
M-11,2	LA JOSEFINA	00° 45' 15,0"	79° 08' 21,6"	DOMINICO
M-13	LA JOSEFINA	00° 45' 33,5"	79° 08' 19,3"	BARRAGANETE
M-13,1	PACHACO	00° 46' 36,9"	79° 09' 14,6"	BARRAGANETE
M-13,2	GUASAGANDA	00° 48' 10,2"	79° 09' 39,6"	BARRAGANETE
M-13,3	GUASAGANDA	00° 48' 17,5"	79° 09' 38,6"	DOMINICO
M-13,4	SAN CRISTÓBAL	00° 52' 26,2"	79° 10' 18,6"	BARRAGANETE
M-14	SAN CRISTÓBAL	00° 52' 26,2"	79° 10' 18,6"	DOMINICO
M-14,1	SAN CRISTÓBAL ETAPA II	00° 53' 36,1"	79° 11' 12,3"	GROSS MICHEL
M-15	SAN GERARDO	00° 53' 55,4"	79° 10' 53,1"	GROSS MICHEL
M-16	EL CARMEN	00° 55' 18,8"	79° 11' 44,9"	DOMINICO COMÚN
M-19	SAN PABLO MALDONADO	00° 55' 27,8"	79° 12' 08,9"	DOMINICO COMÚN
M-*	SECTOR LAILA 4 MANGAS	01° 02' 38,7"	79° 19' 13,3"	DOMINICO HARTÓN
M-**	SECTOR LAILA 4 MANGAS	01° 02' 38,7"	79° 19' 13,3"	DOMINICO
M-***	SECTOR LAILA 4 MANGAS	01° 02' 38,7"	79° 19' 13,3"	DOMINICO
M-v	TRAYECTO CHIPE III	01° 01' 45,8"	79° 19' 29,7"	DOMINICO HARTÓN
M-12,3	COLONIA CHIPE III	00° 01' 07,8"	79° 19' 16,7"	DOMINICO
2MM-2	COLONIA CHIPE III	01° 00' 28,9"	79° 19' 15,4"	DOMINICO HARTÓN
2MM-5	COLONIA CHIPE III	01° 00' 28,9"	79° 19' 15,4"	BARRAGANETE

2MM-5,1	COLONIA CHIPE III	01° 00' 28,9"	79° 19' 15,4"	DOMINICO
2MM-7	COLONIA CHIPE III	01° 00' 45,8"	79° 18' 57,0"	DOMINICO
2MM-7,3	CHIBE III	01° 00' 21,5 "	79° 18' 38,4 "	DOMINICO HARTÓN
2MM-8	CHIBE II	00° 59' 37,7"	79° 18' 26,9"	DOMINICO HARTÓN
2MM-8,1	CHIBE II	00° 59' 37,7"	79° 18' 26,9"	BARRAGANETE
2MM-12	CHIBE II	00° 59' 26,3"	79° 18' 25,6"	DOMINICO HARTÓN
2MM-13	CHIBE II	00° 59' 19,8"	79° 18' 27,6"	BARRAGANETE
2MM-16	CHIBE II	00° 59' 19,8"	79° 18' 27,6"	DOMINICO HARTÓN
2MM-17	CHIBE I	00° 57' 51,1"	79° 18' 15,9"	DOMINICO
2MM-17,3	CHIBE I	00° 57' 51,1"	79° 18' 15,9"	DOMINICO HARTÓN
2MM-18	COMUNA CHIPE I	00° 58' 04"	79° 17' 50"	DOMINICO HARTÓN
2MM-18,3	COMUNA CHIPE I	00° 58' 04"	79° 17' 50"	DOMINICO
2MM-19	COMUNA CHIPE I	00° 58' 09,3"	79° 17' 45,8"	DOMINICO HARTÓN
2MM-19,1	COMUNA CHIPE I	00° 58' 09,3"	79° 17' 45,8"	DOMINICO
2MM-20	CHIBE I	00° 58' 35,5"	79° 17' 44,2"	DOMINICO HARTÓN
2MM-22	CHIBE I	00° 58' 35,5"	79° 17' 44,2"	DOMINICO
2MM-22,1	SECTOR EL TRIUNFO	00° 58' 38,6"	79° 17' 18,8"	DOMINICO HARTÓN
2MM-22,2	SECTOR EL TRIUNFO	00° 58' 40,7 "	79° 16' 41,0"	DOMINICO HARTÓN
2MM-23	SECTOR EL TRIUNFO	00° 58' 58,8"	79° 16' 12,6"	DOMINICO
3MM-1	ESTERO HONDO I	00° 58' 47,7"	79° 15' 46,2"	DOMINICO
3MM-2	ESTERO HONDO II	00° 58' 26,1"	79° 15' 44,2"	DOMINICO
3MM-4	SECTOR LA LIBERTAD	00° 57' 45,7"	79° 15' 26,1"	DOMINICO
3MM-4,1	SAN CRISTÓBAL	00° 52' 42,6"	79° 11' 01"	DOMINICO HARTÓN
3MM-5	SAN GERARDO (ENSAYO)	00° 52' 48,8"	79° 11' 13,8"	BARRAGANETE
3MM-7	MANGUILITA-S.ANTONIO	00° 54' 02"	79° 11' 25,8"	DOMINICO
3MM-7,2	MANGUILITA-SAN ANTONIO	00° 54' 02"	79° 11' 25,8"	DOMINICO
3MM-7,3	MANGUILITA CHICO	00° 54' 19,9"	79° 11' 53,6"	DOMINICO
3MM-8	MANGUILITA-EL TRIUNFO	00° 54' 37,7"	79° 12' 28,5"	DOMINICO NEGRO

3MM-8,1	EL MORAL	00° 56' 36,7"	79° 16'19,3"	BARRAGANETE
3MM-9	SAN JACINTO- CHIPE HAMBURGO	00° 56' 42,4"	79° 17'47,5"	GROSS MICHEL
3MM-9,1	SAN JACINTO- CHIPE HAMBURGO	00° 56' 42,4"	79° 17'47,5"	DOMINICO COMUN
3MM-10	COLONIA CHIPE 1	00° 56' 58,7"	79° 18'33,1"	DOMINICO GIGANTE
3MM-11	COLONIA CHIPE 1	00° 57' 48,3"	79° 18'30,7"	DOMINICO
3MM-12	COLONIA CHIPE 1	00° 57' 48,3"	79° 18'30,7"	WILLIAMS
3MM-14	CHIPE II – SAN JACINTO	00° 59' 08,9"	79° 18'34,3"	DOMINICO
3MM-17	ENTRADA LA ESMERALDA	00° 59' 02,3"	79° 17'50,9"	DOMINICO
3MM-19	LA ESMERALDA	00° 59' 07,9"	79° 17'24,1"	DOMINICO HARTÓN

ZONA: EL CARMEN

CÓDIGO	LUGAR	COORDENADAS		CULTIVAR HOSPEDERO
		S	W	
MC-2,1	LOS ALMENDROS	00° 21'52,7"	79° 34' 17,6"	BARRAGANETE
MC-4C	LOS ALMENDROS	00° 21'42,8"	79° 34' 11,8"	BARRAGANETE
MC-6	SAN RAMON TIGRILLO	00° 20'49,3"	79° 34' 12,0"	BARRAGANETE
MC-6,2	SAN RAMON TIGRILLO	00° 20'29,8"	79° 34' 2,3"	BARRAGANETE
MC-6,2	SAN RAMON TIGRILLO	00° 20'05,4"	79° 33' 55,6"	BARRAGANETE
MC-8	LA RAIZ	00° 19'34,9"	79° 33' 36,2"	BARRAGANETE
MC-11	LA RAIZ	00° 18'54,1"	79° 32' 40,9"	BARRAGANETE
MC-12	SANT. ROSA D VENADO	00° 18'38,7"	79° 31' 52,9"	BARRAGANETE
MC-12B	SAN AGUSTIN	00° 14'21,4"	79° 30' 50,0"	BARRAGANETE
MC-D	SAN AGUSTIN	00° 14'56,3"	79° 30' 48,9"	BARRAGANETE
MC-D*	WILFRIDO LOOR	00° 17'10,6"	79° 34' 47,5"	BARRAGANETE
MC-F	SAN PEDRO DE ZUMA	00° 14'50,6"	79° 32' 02,1"	BARRAGANETE
2MC-2	SAN PEDRO DE ZUMA	00° 12'16,5"	79° 32' 10,4"	BARRAGANETE
2MC-3	SAN PEDRO DE ZUMA	00° 12'10,8"	79° 32' 25,6"	BARRAGANETE
2MC-3,1	EL PALMAR	00° 15'16,2"	79° 33' 49,7"	BARRAGANETE

2MC-4	EL PALMAR – LAS MERC	00° 14'53,4"	79° 34' 07,3"	BARRAGANETE
2MC-4,1	EL CARMEN	00° 55'52,4"	79° 12' 35,6"	DOMINICO COMÚN
2MC-6	LAS MERCEDES	00° 14'32,8"	79° 34' 42,6"	BARRAGANETE
2MC-6,1	LA PALIZADA	00° 32'52"	79° 35' 17,6"	GROSS MICHEL
2MC-8	LA PALIZADA "R. COBEÑA"	00° 32'39,8"	79° 35' 25,4"	BARRAGANETE
2MC-8,3	SALIDA PALIZADA	00° 32' 04, 2"	79° 35' 26"	BARRAGANETE
2MC-9	LA FORTUNA	00° 31' 22, 5"	79° 34' 44,9"	BARRAGANETE
2MC-11	LA FORUNA	00° 31'01,8"	79° 34'38,8"	BARRAGANETE
2MC-11,1	LA ALEGRÍA	00° 30'22,3"	79° 34' 28,7"	BARRAGANETE
2MC-13	ENTRADA VARGAS TORRES	00° 29'13,6"	79° 34' 18,9"	BARRAGANETE
2MC-15	LA BRAMADORA	00° 28'08"	79° 33' 23,0"	BARRABANETE
2MC-15,1	SALIDA BRAMADORA	00° 27'57,3"	79° 33' 15,4"	BARRAGANETE
2MC-16	LA PIEDRA	00° 26'42,2"	79° 33' 11,7"	BARRAGANETE
2MC-18	LA CANCHA	00° 26'18,1"	79° 34' 07,7"	BARRAGANETE
2MC-19	LA PIEDRA	00° 24'54,9"	79° 33' 14,3"	BARRAGANETE
2MC-20	CAMPAMENTO	00° 24'00,6"	79° 33' 29,2"	BARRAGANETE
2MC-21	MATA PALO	00° 23'35"	79° 32' 53,4"	BARRAGANETE
2MC-23	EL PORVENIR	00° 20'54,6"	79° 31' 28"	BARRABANETE
2MC-25	EL PORVENIR	00° 20'37,6"	79° 31' 04,1"	BARRAGANETE
2MC-27	EL CAÑABERAL	00° 20'14,2"	79° 30' 58"	BARRAGANETE
3MC-1	LA ESPERANZA	00° 19'17,7"	79° 30' 21,1"	BARRABANETE
3MC-3	Y DE OCAMPO	00° 18'50,4"	79° 28' 53,8"	BARRAGANETE
3MC-5	VIA PALMASOLA	00° 20'11,7"	79° 29' 51,2"	BARRAGANETE
3MC-5,1	LA PALMASOLA	00° 19' 34,8"	79° 29' 28,1"	BARRAGANETE
3MC-6	TRES RANCHOS	00° 18' 13,1"	79° 28' 26,7"	BARRABANETE
3MC-7	VENADO	00° 18' 03,9"	79° 30' 35,6"	BARRAGANETE
3MC-9	LA RAIZ	00° 18' 38,6"	79° 31' 52,7"	BARRAGANETE
3MC-12	LA RAIZ	00° 19' 02,6"	79° 33' 07,4"	BARRABANETE

3MC-13	SAN RAMON DE TIGRILLO	00° 20' 33,6"	79° 34' 01,8"	BARRAGANETE
3MC-15	LOS ALMENDROS	00° 21' 33,5"	79° 34' 06,8"	BARRAGANETE
3MC-17	LOS ALMENDROS	00° 21' 52,6"	79° 34' 17,6"	BARRAGANETE
3MC-18	KM 25 PUERTO NUEVO	00° 06' 13"	79° 37' 21,6"	BARRAGANETE
3MC-19	KM 24 PUERTO NUEVO	00° 06' 49,3"	79° 36' 43,4"	BARRAGANETE
3MC-20	KM 22,5 PUERTO NUEVO	00° 07' 15,4"	79° 36' 00,1"	BARRAGANETE
3MC-20,1	EL COMUNAL	00° 08' 02,5"	79°34' 43,49"	BARRAGANETE
3MC-21	KM 18 VIA PEDERNALES	00° 08' 25,5"	79° 34' 10,9"	BARRAGANETE
3MC-22	EL COMUNAL P EL P	00° 08' 53,4"	79° 33' 53,8"	BARRAGANETE
3MC-23	KM 15	00° 10' 12,6"	79° 33' 15,1"	BARRAGANETE
3MC-DC	KM 13	00° 10' 35,4"	79° 32' 37,3"	BARRAGANETE
3MC-B	KM 8,5 LAS MRC DE AGUA S	00° 11' 11,8"	79° 30' 31,3"	BARRAGANETE
3MC-B2	KM 2	00° 14' 07,1"	79° 29' 05,1"	BARRAGANETE
3MC-D	NTRD SAN PEDRO DE SUMA	00° 15' 35,1"	79° 33' 38,6"	BARRAGANETE
3MC-D*	KM 6 VIA CHONE EL CARMEN	00° 15' 27,1"	79° 30' 55"	BARRAGANETE
3MC-DD	SAN AGUSTIN (ENS MIXT)	00° 14' 21,4"	79° 30' 49,9"	BARRAGANETE
3MC-C	SALIDA EL CARMEN	00° 15' 34"	79° 23' 34,2"	PLÁTANO MAQUEÑO