

LA PROTECCIÓN DEL BANANO CONTRA LA SIGATOKA NEGRA POR MÉTODOS NO BIOCIDAS

THE PROTECTION OF BANANA AGAINST BLACK SIGATOKA DISEASE THROUGH NON BIOCIDAL METHODS

Fernando Echeverri*

RESUMEN

Echeverri F.: La protección del banano contra la Sigatoka Negra por métodos no biocidas. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **37** (145): 519-525, 2013. ISSN 0370-3908.

La investigación básica es necesaria para crear bienes útiles a la sociedad o para mejorar procesos tecnológicos; actualmente se requieren nuevas alternativas para controlar microorganismos patogénicos a cosechas importantes. En este trabajo se reporta la búsqueda de nuevos métodos y moléculas contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis f. sp. difformis*, causante de la enfermedad conocida como Sigatoka Negra en banano y plátanos, que afecta las exportaciones colombianas y requiere la aplicación de altas cantidades de pesticidas sintéticos contaminantes. Mas allá de los conocimientos científicos y tecnológicos, otros hechos se deben considerar al desarrollar un producto para el mercado de los agroquímicos

Palabras Clave: banano; enfermedad, hongo, control, protección

ABSTRACT

Basic science research is necessary to create innovative goods for the society or to improve technological process; now, other alternatives are required to control pathogenic microorganism to important crops. In this paper, new methods and molecules are reported against the *M. fijiensis f. sp. difformis*, the causal agent of the disease named Black Sigatoka in banana and plantain, which affects colombian exports and requires the application of high amounts of synthetic pesticides. Beyond science and technology knowledge, other facts must be considered to develop a novel product for the agrochemical market.

Keywords: banana, disease, fungi, control, protection

Introducción

En los países en desarrollo, son usuales los reclamos de algunos sectores de la sociedad respecto a los reducidos aportes

que le generan la academia y la investigación, cuando hay graves problemáticas industriales, sanitarias, nutricionales y económicas que debe solucionarse urgentemente. De manera paralela a esos problemas, también hay una alto potencial

* Profesor, Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21, Medellín-Colombia. Consultor Sustainable Agrosolutions SA, Ctra. N-240. Km 110, 25100 Almacelles, Lleida, España

de uso de la biodiversidad, que abunda en sus territorios. De manera similar, son comunes las mutuas recriminaciones de los sectores académico, gubernamental y empresarial, en cuanto al divorcio que existe entre ellos, aunque los dos últimos son ávidos de fomentar lo que se ha llamado Investigación Aplicada, pues conciben el proceso científico como una receta mágica que rápidamente y de manera muy barata, da lugar a productos y bienes apropiables, sin tener en cuenta que ese hipotético edificio de aplicaciones se construye con los conocimientos primigenios generados por silenciosos investigadores, dentro de lo que se conoce como Investigación Básica.

A continuación se reporta la búsqueda de una sustancia implicada en la protección del banano contra un hongo patógeno, de manera no biocida, y que fue concebida a partir de conocimientos básicos en química de productos naturales.

Resultados y discusión

Los orígenes

La química de orgánica de productos naturales involucra varias ramas del saber humano y ha sido el pilar fundamental en el desarrollo de la Farmacología, la Toxicología, la Química Orgánica y la Bioquímica, entre otras. De hecho, buena parte de los medicamentos fueron desarrollados con base en el efecto de varios productos naturales, pero otros campos, tales como la Agronomía, también han recibido el beneficio de antibióticos, insecticidas, herbicidas, fungicidas y reguladores del crecimiento (Dayan *et al.* 2011; Hütter, 2011).

Al respecto, entre el 20-40% de las cosechas, se pierde por efecto de microorganismos, bien sea en planta o durante el transporte y almacenamiento (Savary *et al.* 2012); para tratar de mantener la producción alimentos en los niveles que exige una creciente población, han sido aplicadas millones de toneladas de sustancias sintéticas, muchas de ellas cuestionadas desde los puntos de vista toxicológico y ecológico. Como consecuencia, entidades estatales y supranacionales, tales como la EPA en Estados Unidos y la EFSA en la Unión Europea, están imponiendo drásticas reglamentaciones al registro y uso de nuevos pesticidas y han reducido notablemente las materias primas necesarias para su elaboración (EPA 2010; European Commission, 2008; Nougadère *et al.*, 2011).

Una opción para protegerlas cosechas se relaciona con la inducción de mecanismos de defensa propios de la planta, específicamente con las Fitoalexinas, que podría ser mas efectiva y amigable con el medio ambiente. Sus orígenes datan de 1940, con el trabajo pionero Muller y Borger (1940), al observar en rodajas de papa, la generación de resistencia

contra una cepa compatible del hongo *Phytophthora infestans*, tratadas previamente con una cepa incompatible del mismo hongo. Postularon que el contacto de la célula vegetal con el microorganismo hacía que la primera produjera una molécula de defensa, llamada por ellos Fitoalexina.

Varias alternativas se han propuesto para usar las fitoalexinas en el control de patógenos de cosechas, pero la que ha llamado la atención consiste en inducir en plantas la producción *in situ*, aplicando sustancias específicas y estructuralmente similares a las que se han aislado de hongos, llamadas Elicitores. El uso de esos Elicitores y de moléculas análogas tiene varias ventajas adicionales sobre los fungicidas sintéticos, como por ejemplo, aplicarse solo en el momento indicado, es decir cuando se prevea la aparición de circunstancias favorables al patógeno, como altas temperaturas y humedad. Adicionalmente, el tiempo de contacto entre la sustancia inductora y el patógeno es muy reducido, lo que implica menores riesgos de resistencia, contrario a los pesticidas sintéticos, que al actuar continuamente y con diferente residualidad favorecen la resistencia.

Las consideraciones anteriores fueron tenidas en cuenta para diseñar una estrategia con el fin de buscar una solución a una enfermedad de origen fúngico que afecta al Banano, un producto muy importante desde el punto de vista agroeconómico, no solo por su incidencia en el empleo y las exportaciones (cerca de los US 700 millones/año), sino también por el volumen de pesticidas que normalmente se necesitan para su manejo (Rey 2011, Lombana 2012), con un costo cercano al 10% de las exportaciones. Pero previamente, se había llevado a cabo trabajos con fitoalexinas en Eucalipto, Tomate de Árbol, Papaya y Frijol, con los cuales se calibraron las posibilidades de las fitoalexinas en la Agronomía.

La Búsqueda

Para comienzos de la década de los 80s se generó en Colombia una alerta acerca de la futura presencia de un hongo patógeno al banano, causante de la enfermedad llamada Sikatoga Negra, producida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*; este afectaba sus hojas y reducía total o parcialmente su capacidad fotosintética, traduciéndose en graves disminuciones de la productividad. Su control en algunos de los principales países productores (Costa Rica, Ecuador y Colombia) exige gastos cercanos a los 200 millones de dólares por año. A partir de entonces y por mas de 20 años, se desarrollaron varios proyectos de investigación básica para conocer la bioquímica de la relación planta-patógeno, en términos de la producción de fitoalexinas, como se describe a continuación.

- a. Análisis de varios carbohidratos aminados como la Kanamicina y la Gentamicina, químicamente relacio-

- nados con sustancias presentes en algunos hongos (Figura 1), para determinar si podían simular la presencia del hongo y por tanto desencadenar la producción de fitoalexinas. Efectivamente, se apreció un cambio en la coloración de las soluciones aplicadas (Echeverri *et al.*, 1986).
- b. Inducción masiva en la superficie de centenares de hojas de banano, para obtener suficiente cantidad de las sustancias producidas por las células vegetales. Después de 2 años, se tuvieron disponibles aproximadamente 5mg de un sólido rojo, cuya cromatografía en

capa fina, indicó la presencia de una serie de sustancias similares a las que se producían en la hoja de banano en los primeros estadios de ataque de la Sigatoka Negra, aunque en concentraciones mucho menores

- c. Análisis estructural de las nuevas fitoalexinas, mediante técnicas bidimensionales de resonancia magnética nuclear (COSY, DEPT, APT, HMQC, HMBC, NOE, ROESY), espectrometría de masas de alta resolución y finalmente, difracción de rayos X. Esas moléculas correspondían a un sistema del tipo fenilfenalenonas, la primera de las cuales fue llamada irenolona (Luis *et al.* 1993) (Figura 2).

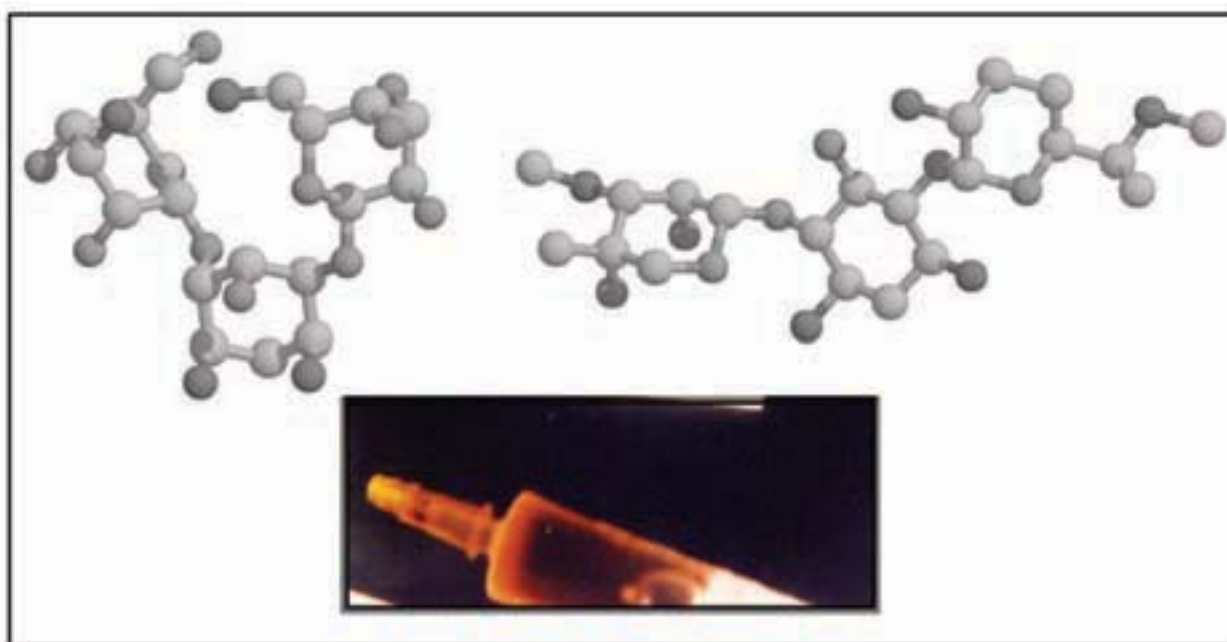


Figura 1. Inductores de fitoalexinas en banano. Izq. Kanamicina, Der. Gentamicina. Inferior: aspecto de las gotas de inductores colectadas a las 72 horas.

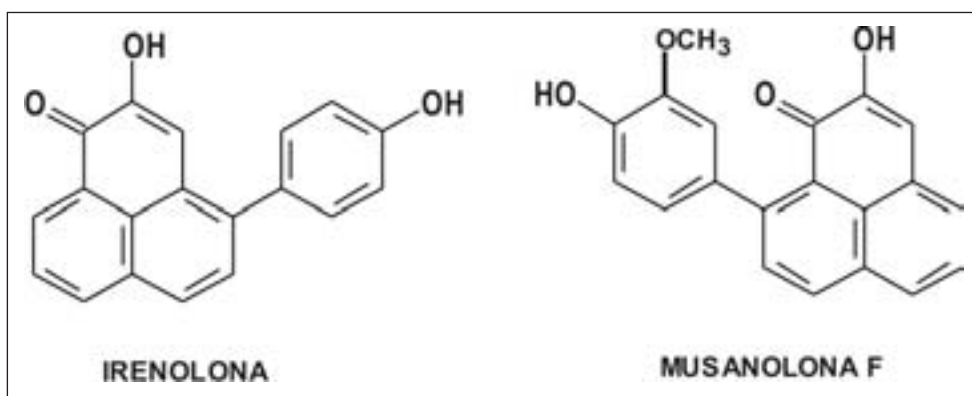


Figura 2. Estructuras de los dos principales grupos de fitoalexinasfenilfenalenónicas de banano.

- d. Aislamiento y purificación de otras fitoalexinas en hojas de banano tratadas con kanamicina, así como en rizomas infectados por el hongo *Fusarium oxysporum*, causante de la enfermedad conocida como Mal de Panamá; obtención de una subclase de fitoalexinas llamada Musanolonas (Luis *et al.* 1996), así como dímeros, alcoholes y anhídridos.
- e. Síntesis de las sustancias naturales y varios análogos estructurales; análisis de la actividad *in vitro* contra la Sigatoka Negra, obteniendo resultados antifúngicos importantes con sistemas del tipo perinaftenona y nitro derivados. (Escobar *et al.*, 2000; Escobar 2002)
- f. Correlaciones entre la fitopatología y la capacidad de generar fitoalexinas de variedades de banano y de plátano (Otálvaro *et al.* 2002).
- g. Análisis de la ruta biosintética, empleando precursores marcados, tales como fenilalanina, acetato y metionina.

A partir del conocimiento acumulado por más de 20 años, surgió una nueva perspectiva planteada por una industria:

tratar de controlar la Sigatoka Negra, apelando a métodos y sustancias no biocidas (Echeverri *et al.*, 2012), con la aplicación de inductores de fitoalexinas. Para ello, se diseñaron inicialmente los requisitos hipotéticos que debería tener una molécula para actuar como inductora en las hojas de banano, entre los cuales cabe resaltar su origen natural, la ausencia de toxicidad, su amigabilidad con el medio ambiente, disponibilidad para satisfacer un mercado del orden de toneladas, así como su carácter renovable.

De millones de sustancias candidatas se seleccionaron diez, de las cuales cinco fueron sometidas a ensayos en vivero en la zona de Urabá, con la colaboración de CENIBANANO. Tres moléculas mostraron una alta capacidad para controlar la Sigatoka Negra (Echeverri *et al.*, 2006); una de ellas se seleccionó entonces para estudios en plantaciones de banano de Colombia, durante dos años mas (Rodríguez *et al.*, 2010).

Los resultados hallados indicaron un nivel de protección similar o superior al de los fungicidas comerciales Tridemorf, Dithane y Clorotalonil, pero con frecuencias de aplicaciones reducidas a la mitad y concentraciones efectivas muy inferiores (Figura 3).

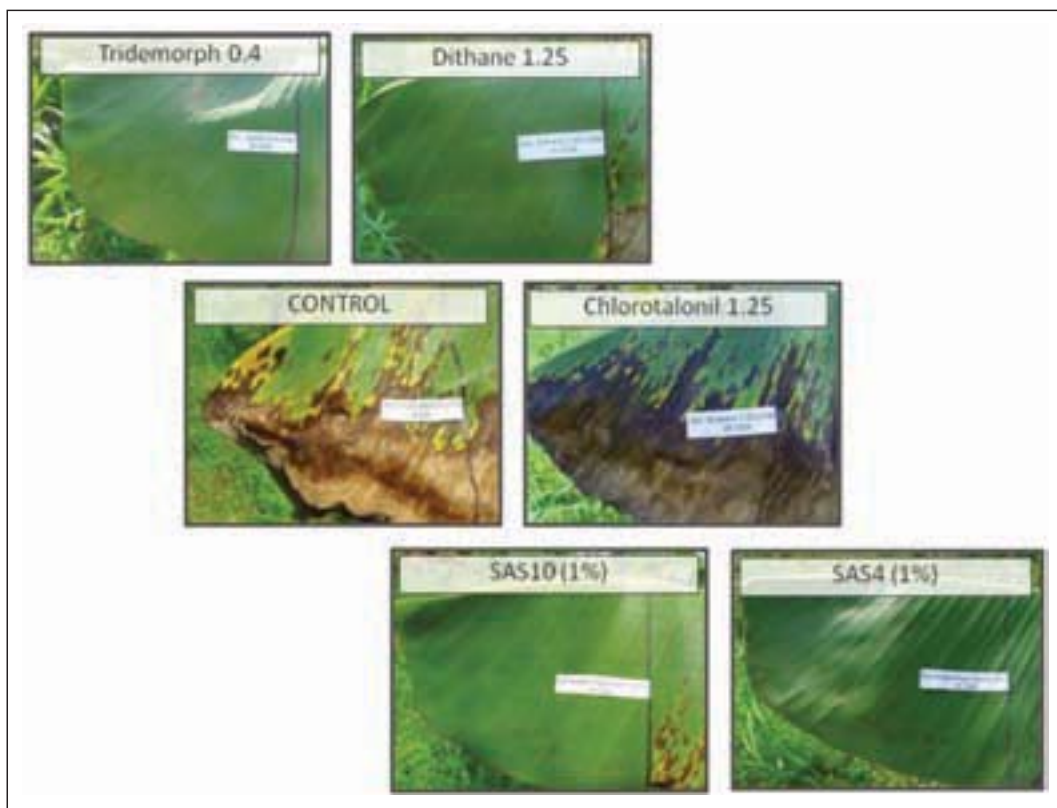


Figura 3. Efectos protectantes de dos inductores de fitoalexinas (SAS10 y SAS4) en hojas de banano, contra *M. fijensis* en el modelo de hoja simple. Parte izquierda de la hoja tratada con el inductor; parte derecha, sin tratar. Nótese la resistencia al clorotalonil.

La acción no biocida fue demostrada a partir de las siguientes evidencias:

- Prácticamente usencia de efectos de la sustancia inductora de fitoalexinas sobre la germinación de ascosporas y crecimiento del túbulo germinativo de *M. fijensis*, tanto de cepas de laboratorio, como colectados en plantaciones afectadas.
- Extractos de hojas tratadas con el inductor provocaron una reducción del crecimiento del túbulo germinativo de *M. fijensis* en un 70%, pero no hubo efectos sobre la germinación de las ascosporas. Esto explica porque en los cultivos siempre hay Sigatoka Negra, pero en niveles fitopatológica y económicamente manejables.
- Por CCF y HPLC/EM, se detectó la presencia de nuevas sustancias en extractos de hojas tratadas con el inductor, cuya estructura corresponde a fenalenonas reportadas como fitoalexinas.

Finalmente, para demostrar la inocuidad del inductor sobre la producción de fruto, se llevó a cabo un ensayo, desde plántula hasta planta con fruto; además de no afectar su calidad y productividad se observó que durante todo este período de tiempo (6 meses) había un nivel muy bajo de la enfermedad, con hojas fotosintéticamente viables y renovadas, a diferencia de las plantas no tratadas, en las cuales predominaban las hojas necrosadas por la Sigatoka Negra (Figura 4).

Posteriormente, y debido a que existen variantes en los cultivos de banano y cepas del hongo, se realizaron ensayos de campo adicionales en otros países productores de banano, como República Dominicana, Ecuador, Costa Rica y México; en 2010 se solicitó la patente (Echeverri *et al.* 2010) que ya esta aprobada en varios países. El rango de aplicabilidad abarca desde cultivos normales hasta aquellos que tienen certificación o que están en el rango de los orgánicos, y además se puede emplear intercalado con los pesticidas sintéticos.

El uso y la aplicación

No basta tener una buena idea, una estrategia investigativa impecable y unos resultados positivos, pues para poder comercializar el producto se necesitan varios requisitos adicionales:

- Tener el producto formulado, de tal manera que se garantice el máximo de efectividad y reproducibilidad de los resultados.
- Obtener el registro de venta en el país que se quiera comercializar. En Colombia, a grandes rasgos se requiere:
 - ♦ Validar los métodos químicos de análisis en un laboratorio acreditado ante la autoridad nacional competente.



Figura 4. Efecto protectante después de 6 meses de tratamiento. Izquierda plantas sin aplicaciones, con muchas hojas necrosadas; derecha, plantas tratada, menor incidencia de la enfermedad.

- ◆ Demostrar sus efectos biológicos, a través de ensayos de campo y de laboratorio. Esto último es relativamente fácil cuando se trata de un fungicida, pues los ensayos *in vitro* se ejecutan sobre cajas de petri, pero cuando es un inductor de defensas como en este caso, la situación es más compleja, ya que la respuesta, como ya se mencionó anteriormente, es indirecta: no es el inductor el responsable de la protección, sino las sustancias producidas por la planta, bien sea a través de fitoalexinas o activando otros mecanismo de defensa.
- ◆ Demostrar la inocuidad de los ingredientes.
- ◆ Usualmente, pueden surgir otros requisitos, como por ejemplo, un concepto de la autoridad ambiental sobre posibles riesgos asociados o derivados del uso y aplicación del producto que se desea registrar.
- Penetrar un mercado, en el cual hay cierta prevención por la innovación.

Hay un punto importante a resaltar; actualmente se prefieren las sustancias que no posean una acción biocida sobre aquellas que tengan ese mecanismo de acción y además que sean de origen natural. Si bien los productos naturales no están totalmente exentos de riesgo y toxicidad, el uso habitual documentado dentro de prácticas etnoculturales del tipo cosmético, alimenticio o terapéutico disminuye algunos ensayos y análisis asociados a la solicitud de registro. Sin embargo, bajo condiciones normales, los tiempos necesarios para cumplir esos requisitos pueden llegar a ser hasta casi el 50% de lo empleado en los ensayos de campo y de laboratorio, lo que indica que para un promedio de 4-5 años de investigación, puede haber más de 2 años de trámites. No importa que exista una evidente urgencia por nuevos productos para controlar una enfermedad que disminuye la producción, rebaja las importaciones, atente contra el medio ambiente y ponga en riesgo centenares de empleos.

Conclusiones

La ciencia siempre ha generado resultados tangibles y útiles para la sociedad, a corto, mediano o largo plazo; a la vez que crea nuevas preguntas e hipótesis concernientes a la investigación básica. Es la capacidad analítica de algunas personas y el olfato de oportunidad de otros, lo que permite definir cuando un resultado puede migrar de lo meramente científico hacia su uso y cuando hacia la generación de conocimiento.

A diferencia del proceso científico, varios interrogantes de la vida diaria se plantean antes de tratar de llenar un vacío técnico o tecnológico, que trascienden mas allá de la demostración científica de sus fundamentos y de su viabilidad:

- Que tan novedoso es el proceso o producto?
- Cual es la demanda actual y la potencial a mediano plazo?
- A quién le interesa?
- Cuales ventajas tiene sobre los productos actuales en el mercado?
- Que tan accesible es obtener la materia prima, a que costo, y con qué rapidez?
- En cuales otros campos tiene aplicación?

Burocráticamente no es fácil hacer investigación aplicada en las Universidades y centros de investigación, mas diseñados para lo que realmente son, centros de saber y formación. Demasiada burocracia, exceso o defecto de reglamentación, falta de directrices, distanciamiento con las empresas, ausencia de experiencia en apropiación del conocimiento, carencia de validación de oportunidades y ortodoxia. Y no solamente allí, pues otros centros de investigación, paradójicamente privados, mantienen altos niveles de autosuficiencia que les impide analizar nuevas perspectivas y estrategias para solucionar los problemas que deben acometer.

También dentro de ese contexto investigativo y tecnológico, muchos insumos de investigación (reactivos, medios de diagnósticos, kits, repuestos, solventes, equipos) y aún de producción son escandalosamente caros y difíciles de obtener. Los grandes laboratorios fabricantes de esos insumos están relativamente cerca: New York por ejemplo, está a sólo 6 horas de los laboratorios de investigación de Medellín, pero a meses y millones de la DIAN y de otros trámites institucionales y nacionales.

Otros casos similares en los cuales se hace efectivo el uso de la Biodiversidad y de los productos naturales están actualmente en desarrollo o son productos, contra Roya del café, Mildeo de flores y Pudrición Gris del Tomate. En alimentos y bebidas con nuevos Colorantes y Surfactantes, y en farmacología, con nuevas sustancias Leishmanicidas y Regeneradores Neuronales.

Agradecimientos

A los estudiantes y colegas del grupo QOPN, que de manera directa o indirecta han participado en momentos de creatividad. Y a las compañías Ecoflora (Colombia) y Sustainable Agro Solutions, por su constante optimismo e infinita paciencia.

Bibliografía

- Dayan, FE, Cantrell, CL, Duke SO. 2011. Natural products in crop protection protectionBioorg. Med.Chem. 17, 2009, 4022-4034.

- Echeverri, F., Lanau, J., Pelaez, C.** 1986. Inducción de fitoalexinas con aminoglicosidos en hojas de banano. *Actualidades Biológicas* 15,100-104
- Echeverri, F., Torres, F., Pineda, R., Zuleta, S.** 2006. Inducción de fitoalexinas en hojas de banano con varios agroquímicos. XVII Reunión ACORBAT 15-20 Octubre. Joinville (Brasil). 683-687.
- Echeverri, F., Justribo, X., Zanuy, C. WIPO.** 2010. Patente WO/2010/109290. Compositions for the protection of crops, method for the application thereof and use of said compositions for the protection of crops. Solicitada.
- Echeverri, F., Torres, F., Quiñones, W., Escobar, G., Archbold, R.** 2012. Phenylphenalenone phytoalexins, will they be a new type of fungicide? *Phytochemistry Reviews* 11,1-14.
- Escobar, G.** 2002. Síntesis de fenilfenalenonas y análogos estructurales y su actividad frente a sigatoka negra. Tesis de doctorado, Universidad de Antioquia. Medellín.
- Escobar, G., Gallego, A., Quinones, W., Echeverri, F., Torres, F., Cardona, G., Rosero, F.** 2000. Synthesis and Antifungal Activity of Musa Phytoalexins and Structural Analogs. *Molecules* 5, 974 - 980.
- EPA.** 2010. Integrated Risk Information System (IRIS). Available from: <<http://www.epa.gov/iris/>>.
- European Commission,** 2008. New rules on pesticide residues in food, Fact sheet, p. 4.
- Hüter, O.** 2011. Use of natural products in the crop protection industry. *Phytochem. Rev.* doi:10.1007/s11101-010-9168-y.
- Luis, J-G., Echeverri, F., Torres, F., Quiñones, W., Cardona, G., Gonzalez, A., Rojas, M., Lopez, M., Aguiar, Z., Brito, I.** 1993. Irenolone and Emenolone: two new types of phytoalexin from *Musa paradisiaca*. *J. Org Chem* 58, 4306-4308
- Luis, J., Kishi, Garcia, F., Abad, T., Cardona, G., Torres, F., Quiñones, W., Echeverri, F.** 1996. Musanolones: Four 9-Phenylphenalenones from rhizomes of *M. acuminata*. *Phytochemistry* 41,753-755
- Lombana, J.** 2012. Desarrollos y Estructuras del Mercado del Banano de Exportación en Colombia (1995 - 2010). Ed. Universidad del Norte. Barranquilla. ISBN 978-958-99167-7-3. 39p.
- Müller, KO, Borger H.** 1940. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora infestans-Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Land Forstwirtschaft.* 23,189-31.
- Nougadère, A., J Reninger, J-C., Volatier, J-L., Leblanc, J-C.** 2011. Chronic dietary risk characterization for pesticide residues: A ranking and scoring method integrating agricultural uses and food contamination data. *Food Chem. Toxicol* 49, 1484-1510.
- Otalvaro, F., Schneider, B., Quiñones, W., Torres, F., Echeverri, F.** 2002. Correlation between phenylphenalenone phytoalexins and phytopathological properties in *Musa*. Structure of a phenylphenalene. *Molecules* 7, 331-340.
- Rey, V.** 2011. Aspectos del manejo de la sigatoka negra con fungicidas. Proyecto sigatoka negra. I Reunión Técnica Bananera de Colombia / Apartadó - Julio 13-14, 2011. Disponible en http://www.augura.com.co/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=91&Itemid=95. Acceso febrero 3-2011
- Rodríguez, R., Echeverri, F., Torres, F.** 2010. Evaluación en campo del inductor de fitoalexinas con pf5 en el control de la Sigatoka Negra *M. fijiensis* Morelet en banano *Musa AAA*. XIX Reunión ACORBAT, 8-12 Nbre Medellín (Colombia) 557-562.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J-N., Hollier, C.** 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security* 4, 519-537.

Recibido: enero 28 de 2013

Aceptado para publicación: 13 de noviembre de 2013