



Tesis presenta para optar por el grado académico de Master
en Biotecnología Vegetal

**Caracterización de aislados de *Pseudocercospora*
fijiensis Morelet para su utilización en programas de
mejoramiento de *Musa* sp.**



Autora: Lic. Mileidy Cruz Martín
Tutor: Dra. Yelenys Alvarado Capó

Santa Clara
2003

*D*espués de culminar el presente trabajo quisiera agradecer:

- Al VLIR, por el soporte económico de este trabajo a través del Proyecto AEIN2000PR230, Development of transgenic lines with resistance to *Mycosphaerella fijiensis* (Black Sigatoka disease) by genetic transformation of banana and plantain varieties with commercial potencial, en especial a su promotor Prof. Dr Ronny Swennen.
- A mis compañero del Laboratorios de Fitopatología Ing. Mayra Acosta, Msc. Michel Leiva y Berkis Roque por el constante apoyo y dedicación.
- A la Dra. Yelenys Alvarado por todos los consejos y constante preocupación por mi superación profesional.
- A Orelvis, Ana Luisa, M^a Ileana, Baby, Neyda, Aminael y Luis por su ayuda solidaria.
- A Lic. Orlando Gregorio, Marta Rodríguez y Osmildo por su colaboración.
- A Novisel Veitía por la ayuda brindada.
- A Maité, Alina, Naivy, Borys, Gallardo, Raúl, Haidé, Clarivel y a todos los trabajadores del IBP que de una forma u otra han propiciado la culminación de esta investigación.
- A mis padres, a mi hermana y mi esposo por el apoyo constante.
- A todos,

MUCHAS GRACIAS.

*Cuando se es joven, se crea.
Cuando se es inteligente, se produce.
No se adapta, se innova:
la medianía copia;
la originalidad se atreve.*

José Martí

*D*edico este trabajo a:

Mis abuelos que fueron para mi ejemplo y guía.

A mis Padres, mi Hermana y mi Esposo por su apoyo incondicional.

RESUMEN

La raya negra de la hoja o Sigatoka Negra, como se conoce en el continente americano, es producida por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y es la enfermedad más importante que ataca la superficie foliar de los plátanos y bananos. Aunque la resistencia a esta enfermedad ha sido el objetivo de los programas de mejoramiento genético durante varios años, poco se conoce sobre lo inherente a la resistencia a estos patógenos o a su diversidad patogénica dentro de las poblaciones. La presente investigación se realizó con los objetivos de: aislar e identificar aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet de diferentes localidades de las provincias de Villa Clara y de Ciego de Ávila, caracterizarlos cultural, morfológica y fisiológicamente así como evaluar su patogenicidad y virulencia sobre cuatro cultivares de *Musa*. Para la caracterización de los aislados se evaluó su crecimiento en medios de cultivo sólido y líquido, se caracterizaron las estructuras de reproducción asexual, se evaluó el efecto del número de subcultivos sobre la producción de conidios y se determinó la Mínima Concentración Inhibitoria de la Higromicina B y el Carbendazim frente a estos. Se obtuvieron nueve aislados de *Pseudocercospora fijiensis* procedentes de pequeñas parcelas de Santa Clara, Vueltas, Santo Domingo, Remedios y de Ciego de Ávila en la Empresa de cultivos varios “La Cuba” cuyas características culturales y morfológicas coincidieron con las referidas en la literatura científica para esta especie. Se demostró que el crecimiento de los aislados de *P. fijiensis* en medio de cultivo líquido estuvo influenciado por la composición de los mismos. El Extracto de Malta resultó ser el más favorable para el crecimiento del micelio. Además, se comprobó que la producción de conidios *in vitro* de aislados de *P. fijiensis* disminuyó con el incremento del número de subcultivos y que esta fue independiente del aislado. Fue posible determinar la MCI de Higromicina B y Carbendazim frente a aislados de *P. fijiensis* con el método de dilución en agar utilizando como inóculo suspensiones miceliales. Los resultados obtenidos evidenciaron la variabilidad de los aislados de *P. fijiensis* en cuanto a la velocidad de crecimiento en PDA, crecimiento en M1-D (peso seco), características morfológicas de las estructuras de reproducción asexuales, susceptibilidad a la Higromicina B y al Carbendazim. Se comprobó la patogenicidad de aislados de *P. fijiensis* sobre genotipos de *Musa* inoculados artificialmente con suspensiones miceliales y se encontraron diferencias en cuanto a su virulencia.

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Generalidades del cultivo de Plátanos y Bananos.....	3
2.1.1 Importancia económica y alimentaria	3
2.1.2 Cultivo de tejidos.....	3
2.1.3 Origen y distribución	4
2.2 Enfermedades de <i>Musa</i>	5
2.3 Sigatoka negra	5
2.3.1 Agente Causal	5
2.3.2 Historia y Distribución de la Sigatoka negra	5
2.3.3 Daños que ocasiona	7
2.3.4 Medidas de lucha.....	7
2.4 <i>Mycosphaerella fijiensis</i>.....	8
2.4.1 Estado sexual	8
2.4.2 Estado asexual	9
2.4.3 Características culturales	10
2.4.4 Variabilidad genética.....	10
2.4.5 Variabilidad patogénica.....	11
2.5 Mejoramiento genético y perspectivas futuras	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Aislamiento e identificación de aislados de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> Morelet ...	16
3. 2 Caracterización cultural, morfológica y fisiológica de diferentes aislados de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>.	18
3.2.1 Crecimiento en diferentes medios de cultivo	18
3.2.1.1 Crecimiento en medio de cultivo sólido	18
3.2.1.2 Crecimiento en medios de cultivo líquido	18
3.2.1.3 Crecimiento en medio de cultivo M1-D.....	19
3.2.2 Caracterización de las estructuras de reproducción asexual de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	19
3.2.3 Efecto del número de subcultivos <i>in vitro</i> de los aislados sobre la producción de conidios	20
3.2.4 Susceptibilidad de suspensiones miceliales de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> a sustancias antimicrobianas.....	21

3.3 Patogenicidad de aislados de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> sobre cultivares de Musa	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Aislamiento e identificación de aislados de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> Morelet ...	24
4.2 Caracterización cultural, morfológica y fisiológica de diferentes aislados de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	25
4.2.1 Crecimiento en diferentes medios de cultivo	25
4.2.1.1 Crecimiento en medio de cultivo sólido	25
4.2.1.2 Crecimiento en medios de cultivo líquido	27
4.2.1.3 Crecimiento en medio de cultivo M1-D.....	29
4.2.2 Caracterización de las estructuras de reproducción asexual de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	31
4.2.3 Efecto del número de subcultivo <i>in vitro</i> de los aislados sobre la producción de conidios	33
4.2.4 Susceptibilidad de suspensiones miceliales de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> a sustancias antimicrobianas	35
4.3 Patogenicidad de aislados de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> sobre cultivares de Musa	37
5. CONCLUSIONES	41
6. RECOMENDACIONES	42
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8. ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

La raya negra de la hoja o Sigatoka Negra, como se conoce en el continente americano, es la enfermedad más importante que ataca la superficie foliar de los plátanos y bananos. Produce grandes pérdidas del área fotosintética tanto por la acción del patógeno como de sus toxinas difundidas (Mourichon, 1995). Esta enfermedad representa una amenaza a la producción de plátanos de todo el mundo y está considerada como la más perjudicial para este cultivo a nivel mundial (Pasberg-Gaul *et al.*, 2000).

El agente causal de la Sigatoka negra es el ascomicete *Pseudocercospora fijiensis* y fue descrito por vez primera por Leach (1964). El ciclo de vida de este patógeno está caracterizado por dos estados: uno sexual (teleomorfo) y otro asexual (anamorfo).

La recombinación genética juega un papel importante en la estructura genética de las poblaciones de *M. fijiensis*, por lo que debería ser considerada como aspecto importante en los programas de mejoramiento genético frente a esta enfermedad. La estructura genética de *P. fijiensis* a escala macrogeográfica ha sido estudiada por Carlier *et al.* (1996) con el empleo de herramientas moleculares (RFLP). Estos autores han encontrado altos niveles de diversidad genética en comparación con poblaciones de otros patógenos (McDonald y Martínez, 1991). La diversidad y la distribución geográfica de poblaciones son principalmente explicadas por la recombinación genética de la fase teleomorfa de *Pseudocercospora fijiensis*. También se han observado diferencias genéticas a escala más pequeña por ejemplo a nivel de campo. Müller *et al.* (1997) empleando técnicas de microsatélite demostraron la variabilidad genética de este patógeno. La misma se detectó en aislados procedentes de una misma lesión, así como entre aislados procedentes de una misma planta, entre plantas, entre cultivares diferentes y entre aislados de diferentes regiones geográficas.

Aunque la resistencia a las Sigatokas ha sido el objetivo de los programas de mejoramiento durante varios años, poco se conoce sobre lo inherente a la resistencia a estos patógenos o a su diversidad patogénica dentro de las poblaciones. Fullerton y Olsen (1995) plantearon 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 plátanos y de manejos de la enfermedad.

Siguiendo el criterio de estos autores de que *P. fijiensis* es muy heterogénea con respecto a la virulencia en *Musa*, se hace necesario el estudio poblacional de este patógeno en las zonas donde serán evaluados genotipos de *Musa*.

Varios autores han señalado diferencias entre aislados de *Pseudocercospora fijiensis* al inocular plantas jóvenes en condiciones controladas (Jácome y Schuh, 1993; Fullerton y Olsen, 1995). Estos últimos encontraron alta variabilidad patogénica en aislados procedentes de diferentes localidades en Papua Nueva Guinea y otras regiones. Esta variabilidad fue detectada en varios genotipos de *Musa* los cuales habían sido propagados por cultivo de tejidos e inoculados con una suspensión conidial. La reacción de los genotipos vegetales a *P. fijiensis* fue diferente para los distintos aislados sugiriendo esto interacciones específicas.

Romero y Sutton (1997^b) quienes inocularon aislados de varias zonas geográficas (Asia, Camerún, Colombia, Costa Rica y Honduras) obtuvieron además de diferencias en la severidad de la enfermedad, diferencias entre el tiempo de inoculación y la aparición de los síntomas lo cual sugiere la variabilidad de la agresividad de los aislados de *P. fijiensis*.

De este modo, las necesidades actuales de investigación consisten en determinar qué tipo de variabilidad patogénica existe en *P. fijiensis*, descubrir la distribución de cualquier variante patogénica e identificar las fuentes de resistencias a esta variante. También merece atención la capacidad de las subpoblaciones resistentes a fungicidas. En general se debe desarrollar un enfoque hacia el estudio y modelación de la epidemiología, distribución y estructura del patógeno a escalas nacionales, regionales e internacionales (Fagan *et al.*, 1997). Todo ello contribuirá a incrementar la eficiencia de los programas de mejoramiento de bananos y plátanos encaminados a lograr la resistencia duradera a Sigatoka negra.

Teniendo en cuenta las razones anteriormente expuestas y considerando la importancia de disponer de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* caracterizados para evaluar la resistencia en condiciones controladas (por inoculación artificial) de genotipos promisorios de *Musa* obtenidos a partir del empleo de variación somaclonal, la mutagénesis o la transformación genética se definieron los siguientes objetivos:

1. Aislar e identificar aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet. de diferentes localidades de la provincia de Villa Clara y de Ciego de Ávila.
2. Caracterizar cultural, morfológica y fisiológicamente aislados
3. Evaluar la patogenicidad y virulencia de aislados.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Generalidades del cultivo de Plátanos y Bananos

2.1.1 Importancia económica y alimentaria

Hoy en día, los bananos y plátanos son cultivados en más de 100 países de las regiones tropicales y subtropicales del planeta y son utilizadas más de 10 millones de hectáreas para su cultivo (Marín *et al.*, 2003). Son componentes importantes de la dieta humana en casi todos los países del mundo, ya sea como alimento cocido o como fruta fresca (Marín *et al.*; 2002).

Como alimento, es fuente importante de carbohidratos, es fuente de fibra, posee bajo contenido de sodio, y es la fuente más rica de potasio y vitamina B₆ lista para consumir (Chandler, 1995, Kodyn y Zapata, 1999). Los bananos y plátanos son considerados el cuarto alimento más importante después del arroz, trigo y maíz en valores de toneladas producidas (Frizon *et al.*, 1997). Mientras que el banano como fruta, ocupa el segundo lugar en toneladas producidas después de la naranja (MusaDoc, 2000).

La producción anual de bananos y plátanos a nivel mundial supera los 76 millones de toneladas y la exportación de estos es clave para la economía de muchos países en desarrollo (Marín *et al.*, 2002).

2.1.2 Cultivo de tejidos

La Biotecnología agrícola tienes como reto, lograr una seguridad alimentaria para los países desarrollados y en vías de desarrollo, asegurando una producción estable de los principales cultivos que se consumen como fuente de alimento.

El mayor aporte práctico de la biotecnología a la agricultura, ha sido posible con el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos. Sus aplicaciones abarcan desde el estudio de la fisiología, obtención de plantas libres de enfermedades, propagación masiva, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios y el mejoramiento. Este último con el empleo de la mutagénesis, la variación somaclonal, la selección *in vitro*, hasta los modernos métodos de transformación genética (Pérez, 1998, Daniels, 1999).

Desde 1972 las técnicas de cultivo *in vitro* se han venido empleando para la multiplicación de diferentes cultivares de bananos y plátanos, mediante el empleo de ápices (Ma y Shii, 1972). Ya en 1980, un amplio rango de especies de *Musa* y cultivares de todo tipo de constitución genómica han sido probados en cultivo *in vitro* (Vulysteke, 1989).

La micropropagación vía organogénesis, mediante yemas axilares, es la técnica de cultivo más conocida y empleada en muchos países a escala comercial para producir distintos clones de *Musa*, además es el método más confiable para lograr un proceso de proliferación repetible, sin modificaciones genéticas y libres de agentes contaminantes (Orellana, 1998). No obstante, en las investigaciones del género *Musa*, otras técnicas de cultivo de tejidos como la embriogénesis somática y el cultivo de células han sido ampliamente utilizadas con fines de multiplicación masiva o mejoramiento genético y ha sido tema de investigación desde los años 60 (Cote *et al.*, 1996, Daniel *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2002). También han sido aplicados los sistemas de inmersión temporal (SIT) (Ventura *et al.*, 1998) y la producción de semilla sintética o artificial por la encapsulación de embriones somáticos o yemas en bananos y plátanos ha recibido considerable atención en años recientes como alternativa interesante de propagación (Rao *et al.*, 1993; Ganapathi *et al.*, 2001).

2.1.3 Origen y distribución

El sureste asiático y las Islas del Pacífico son considerados el centro de origen de los bananos silvestres (De Langhe, 1996, Robinson, 1996). El cruzamiento natural de varios diplíodes no comestibles de *M. acuminata* durante muchos años dio como resultado híbridos partenocarpícos, con esterilidad femenina, fruto comestible y triploides en su estructura genómica. Estos bananos fueron seleccionados, cultivados, propagados y distribuidos localmente como cultivo alimenticio.

Estos diplíodes y triploides seleccionados de *M. acuminata* fueron llevados a áreas más secas donde otros diplíodes silvestres *M. balbisiana* fue desarrollado naturalmente, ocurriendo hibridaciones interespecíficas entre *M. acuminata* y *M. balbisiana* (Robinson, 1996). El producto de estas hibridaciones ha sido diseminado en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Esto ha propiciado que, al igual que en otras especies vegetales, un gran número de plagas y enfermedades hayan sido ingresadas a nuevas áreas junto con el cultivo.

2.2 Enfermedades de *Musa*

Los plátanos y bananos son susceptibles a un gran número de enfermedades que han afectado seriamente la industria dedicada a la producción y la exportación de estos cultivos entre los que se encuentra el *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y el Banana Bunchy Top virus (BBTV), nemátodos barrenadores (*Radopholus similis*), enfermedad del Moko (*Ralstonia solanacearum*) (Jain, 2002; Marín *et al.*, 2003).

Sin embargo, ninguna de estas y otras plagas y enfermedades ha producido daños tan severos a la producción de bananos y plátanos como las Sigatokas (Mourichon y Fullerton, 1990; Carlier *et al.*, 2000).

Los tres principales patógenos fungosos de las manchas foliares del banano son la *Mycosphaerella musicola*, que causa la enfermedad de la Sigatoka (Sigatoka amarilla), *M. fijiensis*, que causa la enfermedad de la raya negra (Sigatoka negra) y *M. eumusae*, la causa de la enfermedad de la mancha foliar *eumusae*. Todos ellos producen serios daños económicos. Debido a la similitud de los síntomas causados por *M. musicola*, *M. fijiensis* y *M. eumusae*, se ha sugerido que las enfermedades causadas por estos tres hongos se denominen manchas foliares de Sigatoka (Jones, 2003).

2.3 Sigatoka negra.

2.3.1 Agente Causal

La Sigatoka negra o raya negra de la hoja, como también se le conoce, es causada por el patógeno fungoso *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, y está muy relacionado con *M. musicola*, agente causal de la Sigatoka amarilla; ambas enfermedades se pueden distinguir solo a nivel morfológico por las características de sus conidios y sus conidióforos (Meredith y Lawrence, 1969; Mulder y Stover, 1976; Carlier *et al.*, 2002).

2.3.2 Historia y Distribución de la Sigatoka negra

La Sigatoka negra fue reconocida por vez primera en 1963 como la enfermedad del estriado negro de las hojas en Islas Fiji, en el distrito de Sigatoka (Rhodes, 1964). Aunque, exámenes realizados a herbarios de especies de *Musa*, indican la posible existencia mucho antes de la

misma, en áreas de Asia y del Pacífico. Leach (1964) describió la morfología del hongo sugiriendo que se debía denominar con el nombre de *Mycosphaerella fijiensis*.

Los primeros informes de la presencia de *Mycosphaerella fijiensis* fuera del continente Asiático fueron en Honduras en 1972 y en Zambia en 1973 (Stover, 1980). Después se encontró en Gabón en 1977 y se dispersó a los países vecinos. Entre 1977 y 1980 se encontró en México y en todos los países de América Central. En la década de los 90', la Sigatoka negra aún seguía expandiéndose y ahora se registra en casi todas partes del mundo. La sigatoka negra fue reportada por vez primera en Cuba en 1991 (Vidal, 1992) y cuatro años después de su aparición, reemplazó a la Sigatoka amarilla en todas las áreas del país (Pérez *et al.*, 2003). Después de llegar a la mayoría de los países de América del Sur a principios de los 90, *M. fijiensis* fue registrada en Bolivia (1996) y Brasil (1998). En el Caribe, se registró en República Dominicana en 1996. Representa actualmente una seria amenaza a la producción bananera en Haití, Puerto Rico y Antillas Menores. En los Estados Unidos se registró en 1998 y donde último se descubrió en América Latina fue en las Islas Galápagos a principios de 2001. En abril de este mismo año, fue registrada por primera vez en un área de producción comercial cerca de Tully en el norte de Queensland (Jácome, 2003).

Cuando esta enfermedad fue encontrada en América Latina, se le denominó al patógeno, *M. fijiensis* var. *difformis* (Stover, 1974). Para separar a *M. fijiensis* var. *fijiensis* y *M. fijiensis* var. *difformis* se usó como criterio el estado anamorfo, debido a que no existían diferencias morfológicas en el estado teleomorfo. *M. fijiensis* var. *difformis* se caracterizaba por la presencia de un estroma que daba origen a pocos o densos fascículos de conidióforos, en contraste con la ausencia de estroma para el estado anamorfo de *M. fijiensis* var. *fijiensis*. Sin embargo, más tarde, estudios taxonómicos de aislados de ambos patógenos revelaron que eran sinónimos (Pons, 1990) lo cual fue confirmado por estudios moleculares (Carlier *et al.*, 1996).

Según Pérez (1996) la Sigatoka negra es una enfermedad específica de las hojas de bananos y plátanos. Los daños a los frutos son indirectos y cuando los daños son fuertes, los racimos tienden a ser más cortos y de menor peso y la pulpa de los frutos presenta un color amarillo con una fuerte tendencia a la madurez prematura pudiendo reducir hasta un 40% su rendimiento total. Según Stover (1974) este evento puede estar inducido por la traslocación de sustancias fisiológicamente activas. Esto trae como consecuencia, además, de las pérdidas en campo por la destrucción de área foliar, grandes pérdidas como resultado de la rápida maduración del fruto la cual ocurre en el campo o durante la transportación o el almacenaje (Marín y Romero, 1992). Sin embargo, Cedeño *et al.* (2000) identificaron a *Mycosphaerella fijiensis* como causa de

lesiones (pecas) en frutos de plátanos cv. Hartón. Estos autores, refieren que las pecas producidas en los frutos producto de este patógeno no dañó la pulpa. Sin embargo, en condiciones de ataques severos puede causar alteraciones estéticas que reducen la calidad del fruto y además, puede convertirse el fruto en propagador de la enfermedad hacia lugares en que esta no exista.

2.3.3 Daños que ocasiona

El rendimiento promedio de plátanos en Cuba en el 2001 fue de 54 833 kg.ha⁻¹ (FAO, 2002). Sin embargo, estos niveles son insuficientes para lograr una estabilidad en el abastecimiento de este producto alimenticio. Varios son los factores que provocan esta situación, siendo la enfermedad causada por *Mycosphaerella fijiensis*, la principal causante de las pérdidas producidas, considerándose la enfermedad más nociva presente en las plantaciones de musáceas en Cuba. La Sigatoka negra es actualmente considerada como la más dañina y costosa de las enfermedades de los plátanos y bananos (Carlier *et al.*, 2000). Stover y Simmonds, (1987) estimaron que en 1985, el costo de la protección contra esta enfermedad, superaba el 27% del costo total de producción. Se ha estimado que las pérdidas en campo por esta enfermedad son superiores a un 76% (Mobambo *et al.*, 1996) y también ocurren grandes pérdidas en los procesos de exportación cuando las medidas de control fallan (Marín *et al.*, 1992).

2.3.4 Medidas de lucha

La Sigatoka negra es controlada fundamentalmente por fungicidas ya que las alternativas no químicas, no han brindado un control aceptable para la comercialización (Romero, 2000).

La alternancia de fungicidas sistémicos con diferentes mecanismos de acción y la combinación de fungicidas sistémicos con fungicidas protectantes han sido métodos utilizados para el control de la Sigatoka negra. Benomil, Propiconazol y Tridemorf han sido los fungicidas sistémicos más utilizados en su control (Romero y Sutton, 1997^a). Estos con su actividad post-infección provee una oportunidad para el uso de un sistema temprano de protección basado en la detección en los estados iniciales de los síntomas (Ganry y Lavilla, 1983). Las primeras referencias de aislados de *Mycosphaerella fijiensis* con resistencia al benomil datan de 1977. Esto se produjo en Honduras, luego del uso intensivo durante tres años de este producto para el control de la

Sigatoka negra (Stover, 1977). No obstante, el Benomil se ha continuado usando en mucho de los países de América Central. Entre 1991 y 1992 la resistencia de *M. fijiensis* al Benomil se incrementó, lo cual ha favorecido el aumento del uso de Propiconazol (Romero y Sutton, 1997^a). Debido al alto costo de los fungicidas, a la no disponibilidad de estos por parte del pequeño agricultor, al problema recurrente de la resistencia del patógeno a los fungicidas y a los daños medioambientales que provoca su utilización, está muy claro que en esta situación, los cultivares resistentes, ofrecen el único método de control viable (Craenen *et al.*, 2000).

El desarrollo de nuevos cultivares de *Musa* representa una especial dificultad para los programas de mejoramiento dado fundamentalmente por los altos niveles de infertilidad, poliploidía, etc. (Fullerton y Olsen, 1995).

Ante la problemática actual ocasionada por la Sigatoka negra en la producción mundial de bananos y plátanos, el conocimiento y la comprensión de la genética y la organización del genoma de *M. fijiensis* podría conducir al desarrollo de nuevas estrategias para su control (Conde *et al.*, 2003). Según Carlier *et al.* (2003), el entendimiento de la estructura genética de la población así como de la biología y evolución de este patógeno proporcionarían información importante para brindar asistencia al mejoramiento y manejo de la resistencia a la enfermedad.

2.4 *Mycosphaerella fijiensis*

Mycosphaerella fijiensis fue descrita por vez primera por Leach (1964). Es un hongo ascomicete heterotálico (Mourichon *et al.*, 1990) y su ciclo de vida está caracterizado por dos estados sexual (teleomorfo) y asexual (anamorfo).

2.4.1 Estado sexual

Los estados sexuales en *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y *M. musicola* son similares (Meredith y Lawrence, 1969; Mulder y Stover, 1976). Los espermogomios se desarrollan hasta que las rayas se convierten en manchas, siendo abundantes en la superficie inferior de las hojas, asociados constantemente con los conidióforos. Estas estructuras son ovales o casi globosas. Miden de 55-88 µm de altura a 35-50 µm de diámetro. Tienen un ostiolo prominente el cual sobresale a través del poro estomático. Los espermácios maduros son hialinos con forma de varilla y miden 2.5-5µm de largo x 1-2.5 µm de ancho.

Los peritecios son abundantes en el estado de las manchas maduras correspondientes al estado 5 y 6 de la escala propuesta por Fouré (1987). Son generalmente globosos con diámetros de 47-85 μm , son inmersos en el tejido de las hojas con ostiolas sobresalientes que se localizan en ambas superficies de las hojas, aunque predominan en la superior. La pared de los peritecios es pardo oscuro, compuesta por tres o más capas de células con forma poligonal. Las ascas son bitunicadas, obclavadas y sin paráfisis. Las ascosporas son hialinas, bicelulares con dimensiones de 12.5-16.5 μm de largo x 2.5-3.8 μm de ancho.

Largos estudios epidemiológicos (Gauhl, 1994) mostraron a las ascosporas como la forma más común de inóculo.

2.4.2 Estado asexual

La fase anamorfa de *M. fijiensis* fue originalmente descrita como: *Paracercospora* sin embargo, recientemente Crous *et al.* (2003) secuenciando la región de los espacios transcribibles internos del ADN ribosomal (ITS) demostraron que *Paracercospora* era sinónimo de *Pseudocercospora* por lo que *Pseudocercospora fijiensis* Morelet sería el nombre correcto de la fase anamorfa de *M. fijiensis*.

Los conidióforos se desarrollan primero en los síntomas de pecas y rayas en la superficie interior de la hoja y continúan produciéndose hasta el segundo estado de mancha (Meredith y Lawrence, 1969). Estos se desarrollan bajo condiciones de alta humedad y su producción es hasta la aparición de puntos necróticos por lo que esta es de corta duración (Gauhl, 1994). Ellos emergen solos o en pequeños grupos a partir de los estomas del interior, ubicados en las lesiones foliares, son de color pardo-olivo siendo más pálidos hacia los ápices. Respecto a su forma son rectos o curvados, frecuentemente con geniculaciones y en ocasiones con estrechamientos basales de hasta 8 μm de diámetro. Pueden tener de uno a cinco septos con dimensiones desde 16.5- 62.5 μm x 4.7 μm ligeramente estrechados hacia el ápice. La presencia de una o más cicatrices en la base de los conidióforos es característica en esta especie. Los conidios son formados en el ápice de los conidióforos de manera simple, más tarde se convierten en laterales según el desarrollo del conidióforo, se pueden unir hasta cuatro de ellos a un conidióforo.

Los conidios pueden variar su color desde pálido hasta oliváceos. Son obclavados hasta cilindro obclavados. Pueden tener de uno a 10 septos encontrando su mayor frecuencia de cinco a siete septos. Pueden ser rectos o curvos, obtusos en el ápice, pueden ser truncados o

redondeados en la base con una contricción visible denominado hilium. Las dimensiones pueden variar de 30-130 μm de largo por 2.5-5 μm de diámetro.

El viento se ha considerado como el principal medio de trasportación de los conidios hacia las plantas cercanas (Rutter *et al.*, 1998), sin embargo, no son encontrados usualmente en el aire sobre las plantaciones (Gauhl, 1994) lo que sugiere que los conidios no juegan un papel importante en el esparcimiento de la enfermedad.

2.4.3 Características culturales

El desarrollo de este hongo en medios de cultivo es lento, una colonia sembrada a partir de un conidio alcanza un centímetro de diámetro luego de 38 días de incubación a 26°C, variando la temperatura de crecimiento óptima desde 24 a 28 °C (Meredith y Lawrence, 1969; Mouliom-Pefoura y Mourichon, 1990). Los cultivos son elevados y estromáticos con una superficie velvética de coloraciones gris pálido, gris rosado oscura y gris pardo (Stover, 1976). Frecuentemente en una misma colonia se encuentran varias coloraciones.

Colonias de 10-21 días pueden producir conidios (Meredith y Lawrence, 1969; Mourichon *et al.*, 1987). La esporulación ha sido referida en algunos medios de cultivo sólido. Carlier *et al.* (2002) encontraron que la esporulación podía ser óptima en medio de cultivo V-8 ajustado a pH 6 e incubado a 20°C bajo iluminación constante.

Mourichon *et al.* (1990), lograron producir peritecios con ascas y ascosporas en condiciones *in vitro*. En condiciones de alta humedad se ha observado que tanto los conidios como las ascosporas germinan adecuadamente.

2.4.4 Variabilidad genética

El primer análisis genético de *M. fijiensis* fue realizado por Carlier *et al.* (1994) utilizando el polimorfismo por restricción de longitud de fragmentos (RFLP). Estos estudios pudieron evidenciar la gran variabilidad entre las poblaciones de este patógeno en diferentes partes del mundo. Fueron encontrados altos niveles de diversidad en este patógeno en el Sureste de Asia, región esta, donde probablemente se originó (Mourichon y Fullerton, 1990). Este marcador genético ha sido además usado en los estudios de interacción y variación intraespecífica en varios patógenos fungosos (Edel *et al.*, 1996, Zhan *et al.*, 2001).

Otras técnicas han sido utilizadas para determinar la variabilidad genética de *M. fijiensis*. Muller *et al.* (1997), empleando técnicas de microsatélites demostraron la variabilidad genética de *M. fijiensis* en plantaciones de plátanos y bananos en Nigeria, encontraron diferencias entre aislados procedentes de una misma lesión, de diferentes lesiones de una misma planta, entre plantas, cultivares y regiones geográficas. Más recientemente, en el año 2003, Rivas y colaboradores, utilizando CAPS (del inglés *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), caracterizaron molecularmente 203 aislados procedentes de América Latina y el Caribe. Los aislados de las regiones de Honduras y Costa Rica mostraron los niveles más altos de diversidad genética, sugiriendo la penetración de patógeno al continente por esta área. Además, apoyan la hipótesis de que más de una introducción ocurrió desde América Latina hacia el Caribe por existir diferenciación suficiente entre las poblaciones caribeñas. También se han caracterizado molecularmente aislados procedentes Cuba utilizando RADP (del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*), confirmando la gran variabilidad genética de este patógeno (Pereira *et al.*, 2001)

Todos estos resultados han confirmado los altos niveles de diversidad genética de *Mycosphaerella fijiensis* comparado con poblaciones de otros patógenos. (McDonald y Martines 1991)

2.4.5 Variabilidad patogénica

Aunque la resistencia a las enfermedades de Sigatoka, primeramente a la Sigatoka amarilla y más recientemente la negra, ha sido el objetivo de programas de mejoramiento genético de *Musa* por varios años, poco se conoce sobre lo inherente a la resistencia a estos patógenos o de la diversidad patogénica dentro de la población del patógeno (Fullerton y Olsen 1995, Frison *et al.*, 1997).

Siguiendo el criterio de Fullerton y Olsen (1995) de que *M. fijiensis* es muy heterogénea con respecto a la virulencia en *Musa*, se hace necesario el estudio poblacional de este patógeno en las zonas donde serán evaluados genotipos de *Musa*.

Varios autores han encontrado diferencias significativas entre aislados de *Mycosphaerella fijiensis* inoculando plantas jóvenes en condiciones controladas (Jacome y Schuh, 1993; Fullerton y Olsen, 1995). Estos últimos encontraron alta variabilidad patogénica en aislados de procedentes de diferentes localidades en Papua Nueva Guinea y otras regiones. Esta variabilidad fue detectada en varios genotipos de *Musa* los cuales habían sido propagados por

cultivo de tejidos e inoculados con una suspensión conidial. La reacción de los genotipos a *M. fijiensis* fue diferente para los distintos aislados sugiriendo esto interacciones específicas.

Según Pereira *et al.* (2001) se hace necesario correlacionar de la información sobre la variabilidad patogénica y genética así como su distribución para un adecuado tratamiento de la enfermedad, comenzando por un uso más racional y efectivo de fungicidas y de las fuentes de resistencia al hongo.

2.5 Mejoramiento genético y perspectivas futuras

Muchos esfuerzos se han unido durante la última década para lograr resistencia a Sigatoka negra en los plátanos de postre y cocción. La prioridad de los programas se ha centrado en investigar niveles altos de resistencia parcial que se consideran más durables frente a la presencia de poblaciones distintas del patógeno.

La variación somaclonal, la selección *in vitro* y la mutagénesis en el género *Musa* se ha empleado con éxito en varios programas de mejoramiento (Novak y Van Duren, 1989; Okole y Schulz, 1997; IAEA, 2002, Roux, *et al.*, 2003)

Otras investigaciones se han desarrollado usando la biotecnología, y en particular la producción de plantas transgénicas que usan genes que codifican para proteínas antifúngicas (Swennen *et al.*, 2003). Sin embargo, este método tiene la desventaja de conferir resistencia monogénica y esta es considerada inestable por la presencia de poblaciones diversas de *Mycosphaerella*. No obstante, esta estrategia pudiera constituir una solución atractiva para lograr resistencia en plantas si se le introdujeran genes de resistencia específicos de plátanos que poseen un nivel alto de resistencia parcial (Mourichon, 2003).

Según el informe de INIBAP presentado por el grupo de Sigatoka en el encuentro en Guadalupe en 1997 (Frison *et al.*, 1997) y ratificado en la 3ra reunión de trabajo del grupo Sigatoka de PROMUSA (Jácome *et al.*, 2003) las principales prioridades de investigaciones deben estar relacionadas con:

- El estudio de la variabilidad patogénica de las poblaciones de *P. fijiensis*, que incluye estimar la extensión y distribución de la variabilidad genética dentro de poblaciones de este patógeno usando marcadores moleculares y su relación con la variabilidad patogénica, cuantificar a nivel de casa de cultivo, la extensión de la variabilidad de *P. fijiensis* con el uso de diferentes set de cultivares de *Musa* (Marcadores patotípicos) y

lograr así una selección en cuanto a virulencia y agresividad y la detección a nivel de campo en diferentes áreas la presencia de cepas patogénicas.

- La estandarización de métodos de inoculación artificial bajo condiciones controladas.
- El estudio de las toxinas producidas por *Pseudocercospora fijiensis*.
- La implementación de colección de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* procedentes de distintas regiones geográficas.

Por todo ello, los estudios de caracterización de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* contribuirían a dar respuesta a estos planteamientos.

3. Materiales y Métodos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas en el período comprendido de septiembre del 2000 hasta octubre de 2003.

Procedimientos generales

Aislado de referencia de *Pseudocercospora fijiensis*

CCIBP-1: Aislado a partir de hojas enfermas en estado 6 (según la escala propuesta por Fouré (1982)) del cultivar Grande naine en la Estación experimental "Pedro Lantigua" de Remedios en la Provincia de Villa Clara perteneciente a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas. Se ha utilizado en los ensayos de evaluación, bajo condiciones controladas, de la resistencia de genotipos de *Musa* a la Sigatoka negra (Leiva *et al.*, 2002).

Medios de Cultivo utilizados.

- Agar Papa Dextrosa (PDA)

Agar Papa Dextrosa (Biocen)...	39g
H ₂ O completar.....	1000ml
pH.....	5.6

- Caldo Papa Dextrosa (PDB)

Caldo Papa Dextrosa (Biocen)	34g
H ₂ O completar.....	1000ml
pH.....	5.6

- Caldo V-8 modificado (Mourichon *et al.*, 1987) (V-8)

Jugo V-8.....	100ml
CaCO ₃	0.2g
H ₂ O completar ..	1000ml
pH	6

- V-8 modificado (Mourichon *et al.*, 1987) (V-8)

Jugo V-8.....	100ml
CaCO ₃	0.2g
H ₂ O completar..	1000 ml
Agar.....	20g
pH	6

- M1-D Modificado (Pinkerton y Strobel, 1976) (M1-D)

KI	0.75mg
KNO ₃	79.8mg
KCl.....	65.0mg
NaH ₂ PO ₄	16.8mg
FeCL ₃	1.20mg
H ₃ BO ₃	1.36mg
MnSO ₄	4.53mg
ZnSO ₄	1.40mg
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0.73g
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂	0.28g
Amonio tartrato.....	5g
Sacarosa.....	30g
Tiamina.....	0.2g
Myoinositol.....	0.8g
Agua de coco.....	20ml
Agua destilada completar	1000ml
pH.....	5.6

- Extracto de Malta (EM)

Extracto de malta (Duchefa)...	50g
Sacarosa.....	5g
H ₂ O completar.....	1000ml
pH.....	5.6

Procesamiento estadístico de los datos

El procesamiento estadístico de los datos de las variables estudiadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 9.0 para Windows. En cada acápite se detalla el procedimiento utilizado para el análisis de las diferentes variables.

3.1 Aislamiento e identificación de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet

Con el objetivo de realizar la caracterización cultural, morfológica, fisiológica y patogénica de *Pseudocercospora fijiensis* se procedió al aislamiento de este patógeno en diferentes regiones dentro de la provincia de Villa Clara y Ciego de Ávila. El aislamiento de *P. fijiensis* se realizó de acuerdo con el método de descarga de ascospora propuesto por Stover (1976) el cual se describe a continuación.

Toma de muestras

Se recolectaron muestras de hojas enfermas en estado 6 (según la escala propuesta por Fouré (1982)). del cultivar de Grande naine (AAA, subgrupo *Cavendish*) de pequeñas parcelas de productores individuales en las cuales nunca se habían aplicado fungicidas, dentro de la provincia de Villa Clara específicamente de las localidades de Santa Clara, Vueltas, Santo Domingo y Remedios (Estación experimental “Pedro Lantigua”) y de la Empresa “La Cuba” en la provincia de Ciego de Ávila.

Procesamiento de las muestras

Las muestras recolectadas se observaron al microscopio estereoscópico, para comprobar la presencia de cuerpos fructíferos (peritecios) maduros en la superficie del tejido foliar. Además, se tomó un peritecio y se le realizó una preparación al microscopio óptico para comprobar la presencia de ascas con ascosporas maduras. Al comprobarse la calidad del material vegetal, se recortaron las hojas que contenían estas estructuras en fragmentos de 7 x 3 cm y se lavaron por separado en una bandeja con agua desionizada estéril durante 5 minutos. Posteriormente, en cabina de flujo laminar, se limpiaron con un algodón previamente humedecido en alcohol al 70%. Los fragmentos de hoja así preparados se presillaron en un papel de filtro que luego se prensó en la cara superior de un recipiente biotecnológico que contenía un portaobjetos con agar agua (3%) y Sulfato de estreptomicina (SIGMA) (50mg.ml⁻¹) colocado sobre un soporte de cristal en uve (Figura 1).

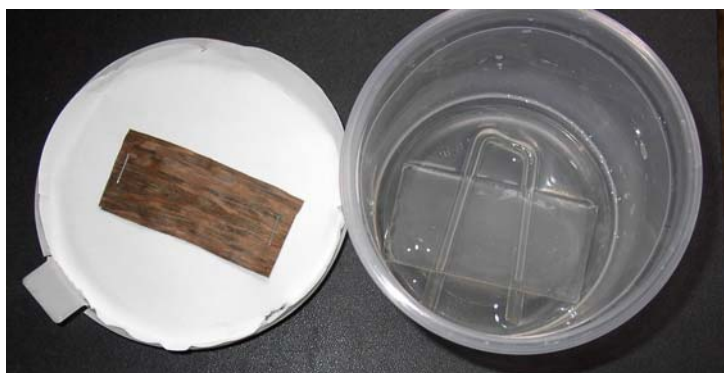


Figura 1. Recipiente utilizado para el aislamiento de *P. fijiensis* utilizando el método de descarga de ascosporas propuesto por Stover (1976).

A cada recipiente se le adicionaron 5 ml de agua desionizada estéril para asegurar una alta humedad relativa. Los recipientes se incubaron a una temperatura de 28°C durante 1 h para la descarga de las ascosporas. Pasado este tiempo, con ayuda de un microscopio óptico *Olympus* y con un aumento de 400x las ascosporas fueron identificadas por su morfología y se procedió a su aislamiento. Estas fueron transferidas a placas de Petri con medio de cultivo V-8 y se incubaron a 20°C con luz fluorescente durante diez días (Carlier *et al.*, 2002). Pasado este tiempo, se comprobó que las características del micelio y de las estructuras de reproducción asexual coincidieran con las referidas para esta especie según Meredith y Lawrence (1969) y Carlier *et al.* (2002). Los aislados así identificados como *P. fijiensis*, se transfirieron a tubos de ensayo con cuñas de medio de cultivo PDA para su caracterización o conservación a 4°C.

3.2 Caracterización cultural, morfológica y fisiológica de diferentes aislados de *Pseudocercospora fijiensis*.

3.2.1 Crecimiento en diferentes medios de cultivo

3.2.1.1 Crecimiento en medio de cultivo sólido

Se evaluó el crecimiento de los aislados obtenidos de *P. fijiensis* (Anexo 1) en medio de cultivo PDA acorde a lo referido por Meredith y Lawrence (1969) y se describieron las características culturales de cada uno en el mismo.

Una suspensión micelial (50 μ l, $5 \cdot 10^3$ ufc.ml⁻¹) de cada uno de los aislados de *P. fijiensis* fue estriada en placas Petri (70 mm Ø) que contenían 15 ml de medio de cultivo PDA para obtener colonias aisladas. Se incluyeron dos placas Petri por aislado, estas se incubaron a 28°C en oscuridad durante 14 días.

Se determinó por observación visual el color del micelio, textura, consistencia, color del reverso, presencia de líquido transpirado y la capacidad del aislado de pigmentar o no el medio de cultivo. Además, se midió el diámetro de diez colonias (mm) en cada aislado. Las evaluaciones se realizaron a los siete y a los 14 días de inoculación.

Los datos de la variable diámetro de las colonias se analizaron por medio de un ANOVA de clasificación simple y las diferencias entre las medias se procesaron a través de la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.2.1.2 Crecimiento en medios de cultivo líquido

Con el objetivo de evaluar el crecimiento de aislados de *P. fijiensis* en diferentes medios de cultivo líquidos se incluyeron en este estudio: V-8, Caldo Papa Dextrosa (PDB) y Extracto de Malta (EM). Para ello se seleccionaron dos aislados, procedentes de Remedios y Ciego de Ávila.

Se inocularon 2.5 ml de suspensión micelial ($5 \cdot 10^5$ ufc.ml⁻¹) en Erlenmeyers de 500 ml que contenían 100 ml de medio de cultivo. Los mismos fueron mantenidos en cámara climatizada (*Gallenkamp*) a 28 °C, oscuridad constante y condiciones estáticas durante 20 días. Transcurrido este tiempo el micelio se separó del medio de cultivo mediante filtración con filtros de papel (Whatman de 125mm Ø), luego el micelio se desecó en estufa a 60°C hasta mantener un peso constante y se le calculó el peso seco con el uso de una balanza

analítica. Además, se determinó por observación visual el color del micelio, el color del reverso, la textura, la consistencia, y la capacidad de pigmentar el medio de cultivo. Se analizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

Los datos de la variable peso seco se analizaron por medio de un ANOVA de clasificación simple y las diferencias entre las medias se procesaron a través de la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.2.1.3 Crecimiento en medio de cultivo M1-D

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar el crecimiento de los aislados obtenidos de *Pseudocercospora fijiensis* (Anexo 1) en el medio de cultivo M1-D utilizado tradicionalmente para la producción de metabolitos fitotóxicos de este patógeno (Hernández, 1995; Okole y Shulz, 1997; García *et al.*, 1997).

Se utilizaron como inóculo suspensiones miceliales ($5 \cdot 10^5$ ufc.ml⁻¹) de cada uno preparadas a partir de cultivos crecidos durante 15 días en medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). Se inocularon 5 ml de suspensión micelial en Erlenmeyers de 500 ml que contenían 200 ml de medio de cultivo. La incubación se llevó a cabo en condiciones similares a las descritas en el acápite 3.2.1.2 y se evaluaron las mismas variables a los 40 días y, además, se le determinó el pH del medio de cultivo. Los Erlenmeyer se dispusieron en la cámara climatizada (*Gallenham*) siguiendo un diseño completamente al azar y se utilizaron seis repeticiones por aislado.

Los valores de las variables peso seco y pH se analizaron por medio de un ANOVA de clasificación simple y las diferencias entre las medias se procesaron a través de la Prueba de Dunnett's C ya que no presentaban homogeneidad de varianza.

3.2.2 Caracterización de las estructuras de reproducción asexual de *Pseudocercospora fijiensis*

Estos experimentos se realizaron con el objetivo de caracterizar morfológicamente las estructuras de reproducción asexual de los aislados obtenidos de *P. fijiensis* (Anexo 1). Para su caracterización fueron inoculados con 300 µl de suspensión micelial ($5 \cdot 10^5$ ufc.ml⁻¹) de cada uno en dos tubos de ensayo con 15 ml de medio de cultivo V-8 (cuña). Estos se

incubaron a 20°C en incubadora *Gallenkamp* con luz fluorescente continua durante 25 días (figura 2).



Figura 2. Incubación de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* para la producción de conidios.

Para la cosecha de los conidios se adicionaron dos mililitros de agua destilada con Tween 80 (0.05%) a cada tubo de ensayo, y la superficie micelial fue removida con un pincel. La suspensión fue transferida a nuevos tubos y se observaron al microscopio óptico (400x) las características morfológicas de los conidios (25 conidios/repeticón). Para ello se tuvieron en cuenta los criterios descritos por Carlier *et al.* (2002) y se evaluaron la forma, el color y la presencia de hilio así como se midió su longitud y ancho (por la zona más gruesa) (μm) y se determinó el número de septos de los conidios y conidióforos.

Los valores de las variables longitud y número de septos de los conidios y conidióforos se analizaron por medio de un ANOVA de clasificación simple y las diferencias entre las medias se procesaron a través de la Prueba de Dunnett's C ya que no presentaban homogeneidad de varianza.

3.2.3 Efecto del número de subcultivos *in vitro* de los aislados sobre la producción de conidios

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar el efecto del número de subcultivos *in vitro* sobre la capacidad de formación de estructuras reproductivas asexuales *in vitro* de *Pseudocercospora fijiensis*. Se compararon los subcultivos uno, cuatro y ocho. A partir de resultados preliminares de este ensayo donde se comprobó que el efecto del número de subcultivos sobre la producción de conidios era independiente del factor aislado se seleccionaron dos por cada uno. Para la producción y cosecha de conidios se siguió un protocolo similar al descrito en el acápite 3.2.2.

Se determinó la concentración de conidios. ml^{-1} por aislado mediante una Cámara de Neubauer. Para ello, se utilizó el microscopio óptico *Olympus* (aumento de 400x) y se hicieron seis mediciones por aislado.

Se utilizó un Anova de clasificación simple y las diferencias entre las medias se procesaron a través de la Prueba de Dunnett's C ya que no presentaban homogeneidad de varianza. Igual procedimiento se siguió para la comparación de la producción de conidios entre los diferentes subcultivos.

3.2.4 Susceptibilidad de suspensiones miceliales de *Pseudocercospora fijiensis* a sustancias antimicrobianas

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de diferentes sustancias antimicrobianas utilizadas como agentes de selección en ensayos de transformación genética de *Mycosphaerella* spp.

Sustancias antimicrobianas:

- Higromicina B (SIGMA, 70 %)
- Carbendazim en forma de un complejo con β -ciclodextrina (Complejo I), (Facultad de Química Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas)

Se incluyeron en este ensayo los aislados obtenidos en el acápite 3.1 (Anexo 1). La susceptibilidad de los aislados frente Higromicina B y Carbendazim se evaluó a partir de la determinación de su MCI en medio de cultivo PDA por el método de dilución en agar.

Se ensayaron concentraciones decrecientes de estos en diluciones seriadas dobles desde 32.0 a 0.015 mg.l^{-1} . Se prepararon dos repeticiones de cada concentración. Además, se incluyeron placas de Petri con medio de cultivo PDA libres de sustancias antimicrobianas para ser usadas como controles de crecimiento.

El inóculo utilizado fue una suspensión de micelio de cada aislado (3.5 μl , 5.10^5 ufc. ml^{-1}) adicionado sobre la superficie del agar (90mm Ø) con micropipeta multicanal.

Las placas de Petri fueron marcadas por el reverso para determinar la orientación de los puntos a inocular, en cada una se colocaron los aislados. Se inoculó primero el control de crecimiento con PDA, después, comenzando por la concentración menor, se inocularon las placas de Petri que contenían las diferentes concentraciones del agente antimicrobiano.

Las placas de Petri se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que la humedad de los inóculos fue absorbida dentro del agar, se invirtieron y se incubaron a 28°C en la oscuridad. Las evaluaciones se realizaron a las 120h. En ellas se comprobó el crecimiento fúngico en los controles y se determinó la MCI de los antimicrobianos tomando como MCI la menor concentración que inhibió completamente el crecimiento fúngico.

3.3 Patogenicidad de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* sobre cultivares de *Musa*

Con el objetivo de evaluar la patogenicidad y virulencia de aislados de *P. fijiensis* sobre cultivares de *Musa*, se ensayaron cuatro aislados de *P. fijiensis*: dos procedentes de Remedios y dos de Ciego de Ávila.

Material vegetal

Plantas obtenidas *in vitro* de cuatro cultivares de bananos: Grande naine (AAA susceptible), Niyarma Yik (AA susceptible), FHIA-18 (AAAB parcialmente resistente) y Calcutta 4 (AA resistente) fueron utilizados para este ensayo. Las plantas fueron aclimatizadas durante 45 días en bandejas de polieturano con sustrato compuesto por 50% de casting, 30% de compost y 20% de zeolita, posteriormente se transfirieron a recipientes plásticos de 10 cm de diámetro con 500 ml de capacidad con igual sustrato por 45 días más.

La preparación de la suspensión micelial, la inoculación y la evaluación fueron realizadas según lo descrito por Alvarado *et al.* (2003) y que se detalla a continuación.

Preparación de la suspensión micelial

Fragmentos de colonias de *P. fijiensis* crecidas durante 14 días a 28°C en medio de cultivo PDA fueron inoculados en erlenmeyer que contenían 200ml de medio cultivo líquido de V-8. Los frascos se incubaron a 28° C en zaranda (130rpm) durante 15 días. Después de este período, el crecimiento micelial fue homogenizado y 1ml de esta solución fue esparcida en placas de Petri con PDA para obtener un crecimiento homogéneo en toda la superficie de la placa. Las placas fueron incubadas en la oscuridad a 28°C durante 15 días. Dos discos de micelio de 1cm² de diámetro fueron inoculados en frascos de 1000 ml de volumen que contenían 400ml de medio cultivo líquido V-8. Los mismos fueron incubados en agitación (130rpm) a temperatura ambiente durante 15 días. La suspensión micelial fue preparada homogenizando 10 g de micelio en 900 ml de agua destilada estéril y filtrada a través de dos capas de gasa para eliminar los fragmentos grandes de micelio. La concentración fue ajustada a 5.10³ ufc.ml⁻¹ y se le adicionó gelatina al 1% al inóculo final.

Inoculación

Fueron inoculadas plantas con 20 cm de alto y al menos con cuatro hojas activas. Esto se realizó aplicando con pincel la suspensión micelial sobre el envés de las tres hojas más jóvenes totalmente extendidas. Se inocularon cinco plantas por cultivar con cada uno de los aislados y, además, se incluyeron cinco plantas de cada cultivar sin inocular para ser utilizadas como controles. Las plantas se ubicaron en una casa de cultivo y se distribuyeron en bloques al azar.

Se esperaron dos horas hasta que se secaran las hojas, al cabo de este tiempo se elevó la humedad relativa al 100% durante tres días y luego se garantizó una humedad por encima del 70%.

Diariamente se registró la temperatura y humedad mediante un Termo-higrómetro electrónico (EM-913).

Evaluación

El experimento se evaluó cada siete días hasta los 60 días. Para ello se utilizó la escala propuesta por Alvarado *et al.* (2003) que aparece a continuación (tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los estados de desarrollo de los síntomas en plantas de *Musa* spp. propagadas *in vitro* inoculadas con suspensión micelial de *Pseudocercospora fijiensis*.

Estado	Descripción de los síntomas
0	Predominio de hojas sin síntoma.
1	Predominio de hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza
2	Predominio de hojas con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el envés de la hoja.
3	Predominio de hojas con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz.
4	Predominio de hojas con manchas negras (elípticas o redondeadas) con bordes cloróticos y halo acuoso. Aún mantiene algunas áreas de tejido verde.
5	Predominio de hojas con manchas negras con centros grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y colgar del pseudotallo.

Se determinó el tiempo de aparición de los primeros síntomas (período de incubación), así como la evolución y la descripción de los síntomas en cada estado.

4. Resultados y Discusión

4.1 Aislamiento e identificación de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet

Se lograron obtener nueve aislados de *Pseudocercospora fijiensis* procedentes de pequeñas parcelas de Santa Clara (CCIBP-80, CCIBP-83), Vueltas (CCIBP-54, CCIBP-66), Santo Domingo (CCIBP-34, CCIBP-64), de Remedios en la Estación experimental "Pedro Lantigua" (CCIBP-39) y de Ciego de Ávila (CCIBP-57, CCIBP-110) procedentes ambos de la Empresa de cultivos varios "La Cuba" (Anexo 1).

Las características de las ascosporas obtenidas a partir de peritecios de tejidos enfermos (estado 6, escala propuesta por Fouré (1982), coincidieron con las referidas para este patógeno por Leach (1964). Fueron hialinas, globosas, con un septo formando dos células unidas y una de las cuales es ligeramente más abultada que la otra (figura 3). En todos los casos, las colonias formadas a partir de las ascosporas se caracterizaron por presentar un color gris oliváceo.

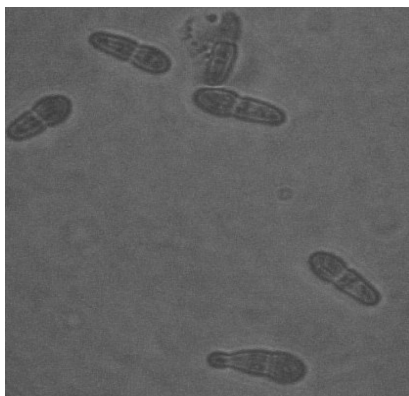


Figura 3. Ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en medio de cultivo Agar-agua (3%).

Se pudo comprobar la presencia del *hilium* basal en los conidios producidos y las características de estos coincidieron con las referidas en la literatura para esta especie (Meredith y Lawrence, 1969; Carlier *et al.*, 2002).

La necesidad de crear y mantener colecciones de *P. fijiensis* procedentes de diferentes regiones ha sido resaltada como prioridad por varios investigadores (Frison *et al.*, 1997) para la realización de estudios relacionados con la biología del patógeno, con el grado de variabilidad patogénica, morfológica y genética así como la pérdida de la sensibilidad frente a diferentes fungicidas. Cuestiones estas que son clave para el manejo de la enfermedad y la asistencia a los programas de mejoramiento de bananos (Fullerton y Olsen, 1995; Carlier *et al.*, 2003).

4.2 Caracterización cultural, morfológica y fisiológica de diferentes aislados de *Pseudocercospora fijiensis*

4.2.1 Crecimiento en diferentes medios de cultivo

4.2.1.1 Crecimiento en medio de cultivo sólido

Las características culturales de las colonias fueron similares para todos los aislados en medio de cultivo PDA (micelio superficial, aterciopelado, elevado, compacto y micelio estromático negro) y coincidieron con las referidas por otros autores en este medio de cultivo (Stover, 1976; Mourichon *et al.*, 2000; Manzo *et al.*, 2001). En todos los casos crecieron colonias de forma convexa, circulares y con bordes regulares. (figura 4).



Figura 4. Colonias de *Pseudocercospora fijiensis* crecidas en medio de cultivo PDA a los 14 días de incubación a 28°C y oscuridad constante.

En cuanto a la presencia de líquido transpirado apareció en todos los aislados pero de diferentes formas (pequeñas gotas muy abundantes y gotas de mayor tamaño menos frecuentes) en todos los casos transparente. No se observó pigmentación en el medio de cultivo en ninguno de los aislados durante los 14 días de evaluación.

Se pudo constatar que los colores de las colonias coincidían con los descritos en la literatura (Stover, 1976; Jeger *et al.*, 1995). Se encontró una gama de colores desde grises oscuros, grises rosados hasta blancos.

El crecimiento lento fue típico para todos los aislados, en correspondencia con lo planteado por varios autores (Meredith y Lawrence, 1969; Manzo *et al.*, 2001) y el diámetro de las colonias después de 14 días no fue superior a 6mm (tabla 2).

No obstante, se encontraron diferencias significativas entre aislados con respecto al diámetro de las colonias. El aislado CCIBP-80, procedente de Santa Clara, mostró los

valores mayores de diámetro de las colonias a los 14 días de incubación siendo el único en sobrepasar los 5 mm, además, de lograr un incremento considerable en diámetro de los 7 a los 14 días. En general, los aislados de Ciego de Ávila presentaron los diámetros menores en ambas evaluaciones.

Tabla 2. Diámetro medio de colonias de diferentes aislados *P. fijiensis* a los siete y a los 14 días de incubación en medio de cultivo PDA.

Aislados	Diámetro 7 días	Diámetro 14 días
CCIBP- 39 ¹	1,38 c	2,97 d
CCIBP- 34 ²	1,94 b	4,11 b
CCIBP-64 ²	1,68 b	2,89 d
CCIBP- 54 ³	1,76 b	3,15 cd
CCIBP-66 ³	3,15 a	4,03 b
CCIBP-57 ⁴	1,69 b	3,56 bc
CCIBP-110 ⁴	1,08 d	1,95 d
CCIBP-80 ⁵	1,75 b	5,16 a
CCIBP-83 ⁵	1,75 b	3,60 bc
E.E	±0.28	±0.18

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según Duncan para $P \leq 0.05$ ¹ Remedios, ² Sto. Domingo, ³ Vueltas, ⁴ Ciego de Ávila, ⁵ Santa Clara

La evaluación del crecimiento en medio de cultivo sólido ha sido estudiada por varios autores para detectar diferencias entre aislados de una misma especie. Leiva (1998) al evaluar el crecimiento en medio de cultivo PDA de aislados de *P. fijiensis* procedentes de una misma localidad encontró diferencias. Por otra parte, Adaskaveg y Hartin (1997) encontraron también este comportamiento entre aislados de *Colletotrichum acutatum* y, Pérez (2003), pudo formar varios grupos de aislados en cuanto al diámetro de las colonias en *Alternaria solani* Sor.

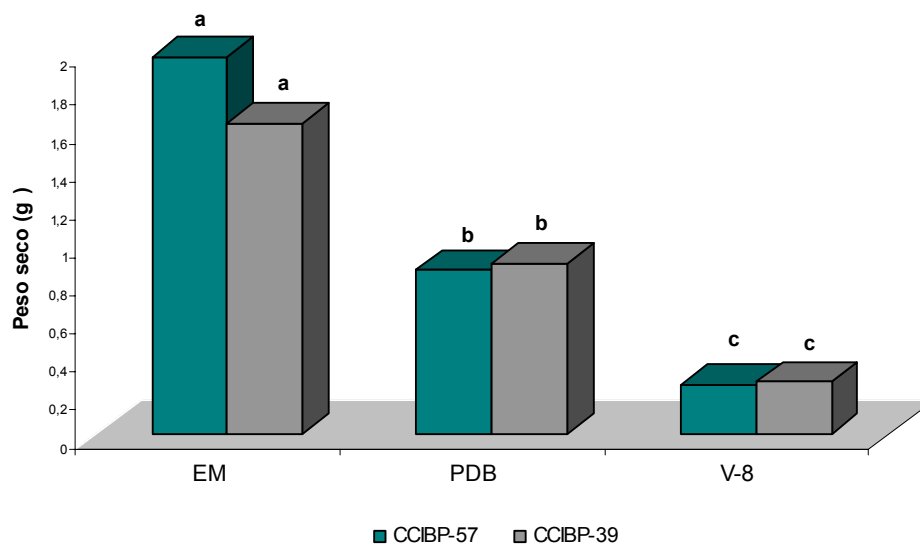
P. fijiensis es un hongo extremadamente variable en sus características culturales propiciado quizás en gran medida por el estado sexual y su naturaleza heterotática reafirmada por Mourichon (1995).

A partir de muestras de hojas enfermas del cultivar Grande naine, procedentes de pequeñas parcelas productoras de cuatro localidades de la provincia de Villa Clara y de una empresa

productora de la provincia de Ciego de Ávila, se obtuvieron nueve aislados de *Pseudocercospora fijiensis* que solo se diferenciaron en cuanto al diámetro de sus colonias en medio de cultivo sólido (PDA) y no en sus caracteres culturales.

4.2.1.2 Crecimiento en medios de cultivo líquido

Se logró el crecimiento de *P. fijiensis* (CCIBP-39 y CCIBP-57) en los medios de cultivo PDB, EM y V-8 y el peso seco del micelio varió en entre ellos (figura 5). Okole (1995) y Manzo *et al.* (2001) refieren cómo el crecimiento del micelio depende del contenido de nutrientes en el medio de cultivo.



EM -Extracto de malta, PDB - Caldo papa dextrosa, V-8 - Caldo V-8 modificado por Mourichon *et al.* (1987)

Figura 5. Peso seco del micelio de los aislados CCIBP-57 y CCIBP-39 de *P. fijiensis* a los 20 días de inoculación en diferentes medios de cultivo. Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según Duncan para $P \leq 0.05$

El Extracto de Malta resultó ser el medio de cultivo más favorable para el crecimiento del micelio en *P. fijiensis* ya que fue en él, donde se obtuvieron los mayores valores de peso seco para ambos aislados. Le siguieron en orden PDB y V-8.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Okole (1995), quien al evaluar cuatro medios de cultivo para la producción de micelio, encontró que en Extracto de Malta se produjo mayor cantidad, este superó a PDA, M1-D y SMGY (glucosa y extracto de levadura).

Otros autores refieren al medio de cultivo V-8 como ideal para el crecimiento fúngico. Este ha sido utilizado desde mucho tiempo atrás para diferentes tipos de hongos (Murk *et al.*, 1942; Miller, 1955). Para *Pseudocercospora fijiensis*, en particular, varios autores han obtenido buenos resultados en la respuesta del crecimiento micelial en caldo V-8 así como en la producción de biomasa de diferentes aislados para los estudios de inoculación de plantas. Este ha sido un medio de cultivo de referencia para el crecimiento de dicho patógeno (Mourichon *et al.*, 1987; Manzo *et al.*, 2001).

El desarrollo de metodologías de selección temprana de cultivares de *Musa* con resistencia a Sigatoka negra es una prioridad de trabajo resaltada por varios autores para garantizar mayores posibilidades de éxito en los programas de mejoramiento genético de bananos (Frison *et al.*, 1997; Romero y Sutton, 1997^b; Alvarado *et al.*, 2003). Entre estas, se destaca la selección de vitroplantas en casas de cultivo utilizando suspensiones miceliales como inóculo (Leiva *et al.*, 2002). Estos autores, resaltan la factibilidad del empleo de micelio por su fácil preparación, la posibilidad de trabajar con una concentración de la suspensión micelial previamente calculada y ajustada así como el poder prepararlo en cualquier época del año. A diferencia de otros inóculos (fragmentos de hojas enfermas y conidios) solamente se requiere para su preparación de un medio de cultivo en que se desarrolle adecuadamente el micelio.

Conocer que el medio de cultivo sintético Extracto de malta permite la multiplicación adecuada de *P. fijiensis*, constituye una alternativa al uso de V-8 para la producción de micelio para ensayos de inoculación artificial.

La coloración y las características del crecimiento del micelio variaron con los medios de cultivo utilizados y fue independiente del aislado (tabla 3).

Tabla 3 Coloración del micelio de los aislados CCIBP-39 y CCIBP-57 desarrollado en diferentes medios de cultivo a los 20 días de incubación.

Aislados	Color del micelio		
	V-8	EM	PDB
CCIBP- 39	rosado	gris-oliváceo	gris
CCIBP- 57	rosado	gris-oliváceo	gris

EM -Extracto de malta, PDB -Caldo papa dextrosa, V-8 -Caldo V-8 modificado por Mourichon *et al.* (1987)

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Manzo *et al.* (2001) al caracterizar el crecimiento de *P. fijiensis* en varios medios de cultivo donde encontraron diferencias en el hábito de crecimiento y en la coloración.

En ninguno de los medios de cultivos evaluados se detectó pigmentación del medio de cultivo hasta los 20 días de incubación.

4.2.1.3 Evaluación del crecimiento en medio de cultivo M1-D

Los valores de peso seco del micelio de los aislados a los 40 días en medio de cultivo M1-D se encontraron entre 0.73 y 1.58 g. Los aislados CCIBP-110 y CCIBP-34 fueron los que numéricamente presentaron los mayores valores de peso seco, ambos por encima de 1.5 g sin embargo, no difirieron estadísticamente de los aislados CCIBP-39, CCIBP-64, CCIBP-57 y CCIBP-80 (figura 6).

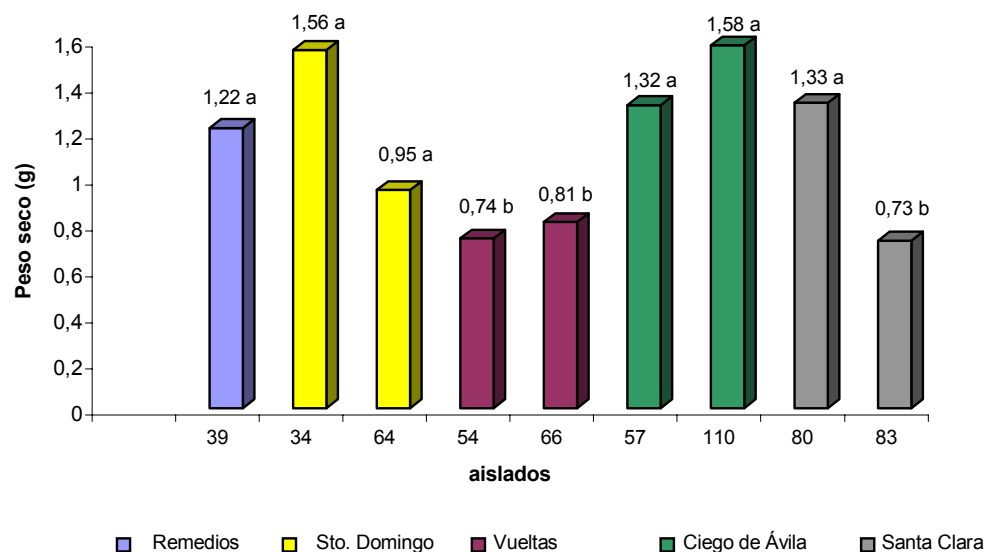


Figura 6. Peso seco (g) de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* crecidos durante 40 días a 28° C, en condiciones estáticas y oscuridad constante en medio de cultivo M1-D. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según Dunnett's C con $P \leq 0.05$

En la literatura consultada sobre este patógeno no se encontraron referencias relacionadas con el comportamiento de diferentes aislados en medios de cultivo líquido, sin embargo, Rojas (1998) encontró diferencias con respecto al peso seco producido en medio de cultivo de Richard por aislados de *Alternaria solani* Sor. Además, encontró un comportamiento diferencial de los aislados en dependencia del medio de cultivo.

En cuanto a los valores de pH no se encontraron diferencias estadísticas entre aislados. Sin embargo, es de destacar que de forma general, el peso seco y el pH, se comportaron como variables inversamente proporcionales (figura 7). Este resultado puede ser indicativo de que el desarrollo del micelio en estas condiciones de cultivo, esté relacionado directamente con el consumo o degradación de componentes del medio de cultivo que provoquen una disminución del pH.

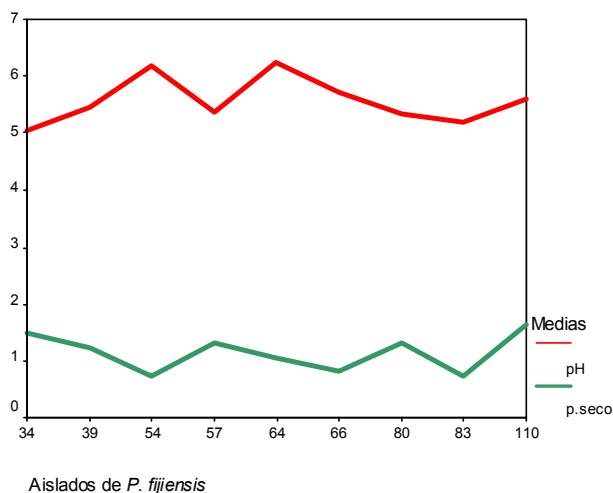


Figura 7. Relación entre peso seco y pH de nueve aislados de *P. fijiensis* a los 40 días de incubación en medio de cultivo M1-D.

En medio de cultivo M1-D los aislados evaluados crecieron de color rosado-grisáceo, aterciopelados y con reverso negro (figura 8).

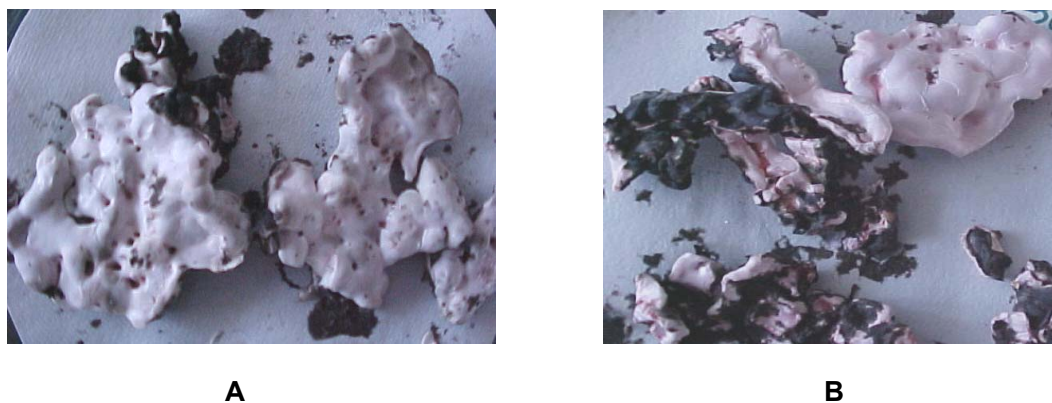


Figura 8. Micelio de los aislados CCIBP-110 (A) y CCIBP-80 (B) de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet producidos en medio de cultivo líquido M1-D a los 40 días de incubación (28°C, oscuridad constante).

El medio de cultivo M1-D en su composición es fundamentalmente salino, ha sido utilizado por varios investigadores para la producción de metabolitos fitotóxicos de *Pseudocercospora*

fijiensis y la obtención de filtrados de cultivo para las pruebas de selección *in vitro* (Hernández, 1995; Okole y Shulz, 1997; García *et al.*, 1997). Según estos últimos autores el uso de estas técnicas en vitroplantas y multiyemas de bananos constituye una herramienta promisorio en los programas de mejoramiento a la resistencia a Sigatoka negra.

Upadhyay *et al.* (1990) encontraron cinco fracciones tóxicas en el extracto crudo de *P. fijiensis* y Strierle *et al.* (1991) aislaron varios compuestos aromáticos de cultivos líquidos de este patógeno.

Para los aislados de *Pseudocercospora fijiensis* evaluados en este ensayo no se encontraron diferencias en las características culturales del micelio (coloración, textura, pigmentación del medio) y sí, en lo referido al crecimiento (peso seco). Este varió entre los aislados independientemente de la localidad de donde procedían. Los resultados obtenidos reafirman la variabilidad de este patógeno y ratifican cómo el conocimiento del crecimiento de los distintos aislados de *P. fijiensis* en este medio de cultivo es indispensable para establecer los esquemas de trabajo en que involucren la producción de filtrados de cultivos de este patógeno.

4.2.2 Caracterización de las estructuras de reproducción asexual de *Pseudocercospora fijiensis*

Las características de los conidios y conidióforos de todos los aislados se correspondieron con las descritas por Meredith y Lawrence (1969) y Carlier *et al.* (2002) para el estado asexual de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (*Pseudocercospora fijiensis*).

Los conidios presentaron color verde pálido a oliváceo, obclavados a cilindro-obclavados, septados, rectos o curvos con presencia de *hilum* basal distintivo (cicatriz) (figura 9).



Figura 9. Conidios de *Pseudocercospora fijiensis* producidos en medio de cultivo V-8 a los 25 días de inoculación a 20°C y en presencia de luz constante.

El ancho de los conidios en todos los aislados se encontró en 4.16 μm . Carlier *et al.* (2002) lo situaron entre 2.5 y 5.0 μm .

En la tabla 4 se muestra la longitud de los conidios y de los conidióforos y el número de septos de estos, en todos los aislados. A pesar de que los valores medios de la longitud de los conidios y conidióforos coincidieron con los descritos por la literatura citada más arriba, se encontraron dimensiones mayores (datos no mostrados). Estos resultados estuvieron en concordancia con lo planteado por Meredith y Lawrence (1969) quienes refirieron que los conidios producidos *in vitro* tienden a presentar dimensiones mayores que aquellos obtenidos en condiciones naturales.

Tabla 4. Longitud y número de septos de conidios y conidióforos de aislados de *P. fijiensis* en medio de cultivo V-8 después de 25 días de incubación.

Aislado	Conidios		Conidióforos	
	Media (µm)	No. septos	Media(µm)	No. septos
CCIBP- 39 ¹	82.01 cd	5.47 c	51.16 b	3.8 a
CCIBP- 34 ²	85.37 bcd	5.90 bc	47.84 ab	2.8 a
CCIBP- 64 ²	93.89 bc	5.47 c	52.95 b	2.4 b
CCIBP- 54 ³	67.54 e	5.19 c	49.93 b	2.7 a
CCIBP-66 ³	109.54 a	6.00 bc	55.34 ab	1.7 b
CCIBP-57 ⁴	83.20 cd	5.66 c	56.58 b	2.2 b
CCIBP-110 ⁴	99.04 ab	5.85 bc	47.84 ab	3.1 a
CCIBP-80 ⁵	87.16 bcd	6.71 a	66.14 a	4.6 a
CCIBP-83 ⁵	76.86 de	5.33 c	67.39 b	2.5 a
E.E	± 6.82	± 0.32	± 0.46	± 0.47

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según Dunnett's C para $P \leq 0.05$. ¹ Remedios, ² Sto. Domingo, ³ Vueltas, ⁴ Ciego de Ávila, ⁵ Santa Clara

Se pudo observar una gran variabilidad entre aislados en cuanto a la longitud de los conidios. Esta se manifestó independientemente del lugar de procedencia ya que aislados de una misma localidad difirieron estadísticamente. Los valores extremos estuvieron dados por el aislado CCIBP-66 (109.54 µm) y por el CCIBP-54 (67.54 µm). Todo esto confirma lo planteado por otros autores cuando se refieren a la alta variabilidad a la que es sujeta *M. fijiensis* debido a su reproducción sexual y por ende la necesidad de su estudio para lograr estrategias efectivas para el mejoramiento de plantas con resistencia a este patógeno (Mourichon, 1995).

4.2.3 Efecto del número de subcultivos *in vitro* de los aislados sobre la producción de conidios

Al evaluar el efecto del número de subcultivos sobre la esporulación de *Pseudocercospora fijiensis* se encontraron diferencias significativas en el número de conidios producidos entre aislados con diferentes números de subcultivos *in vitro*. A medida que se incrementó el número de subcultivos, disminuyó la producción de conidios. (figura 10).

No existieron diferencias estadísticas entre los aislados con igual número de subcultivos (Anexo 2) por lo que se corroboró que el factor número de subcultivo fue el de mayor significación en los resultados obtenidos.

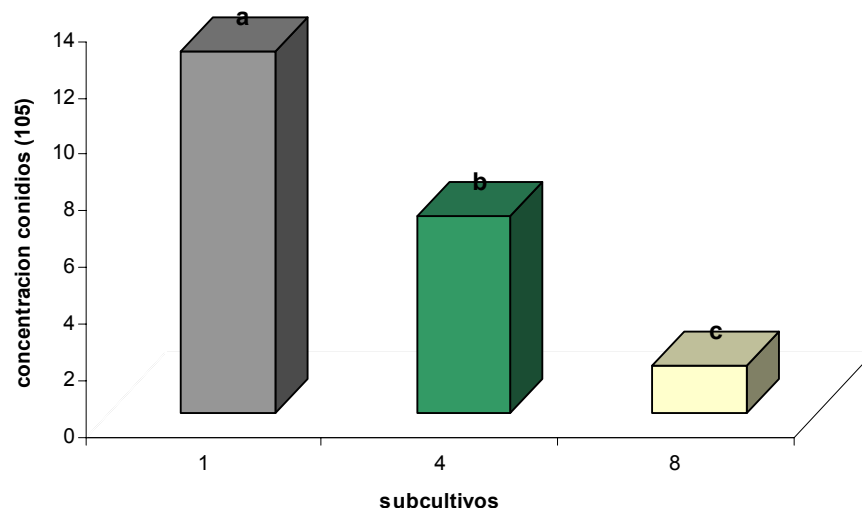


Figura 10. Media de la concentración de conidios por subcultivos *in vitro* de aislados de *Pseudocercospora fijiensis*. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según Dunnett's C para $P \leq 0.05$

Como se muestra en la figura 10, a partir del cuarto subcultivo se manifestó una reducción significativa de la cantidad de conidios producidos y al cabo del octavo subcultivo, la esporulación disminuyó en un 80 % con respecto a la obtenida con aislados con solo un subcultivo (CCIBP-34, CCIBP-66).

La producción de conidios *in vitro* en *Pseudocercospora fijiensis* ha sido estudiada por varios autores (Stover, 1976; Mourichon *et al.*, 1987, Romero y Sutton, 1997^b) con el objetivo de la utilización de estos como fuente de inóculo para los ensayos de inoculación artificial para la selección temprana de cultivares de *Musa* con resistencia a Sigatoka negra. Mourichon *et al.* (1987) al comparar conidios y micelio como inóculo, encontraron que los conidios constituyen, por las posibilidades de calibración y la velocidad de aparición de los síntomas, la mejor fuente de inóculo, sin embargo, refieren como inconveniente, el carácter fluctuante de la esporulación *in vitro* durante los subcultivos sucesivos. Según Meredith y Lawrence (1969) el cultivo *in vitro* prolongado de *P. fijiensis* puede provocar la pérdida de la capacidad de producción de conidios bajo estas condiciones.

El número de subcultivos *in vitro* influyó negativamente en la cantidad de conidios producidos por *P. fijiensis* y fue independiente de los aislados evaluados. En los programas

de mejoramiento de *Musa* spp. donde se empleen metodologías de selección temprana de genotipos con resistencia a Sigatoka negra y se utilicen los conidios como fuente de inóculo es imprescindible contar con aislados del patógeno que mantengan la capacidad de producirlos *in vitro* por lo estos necesitan ser conservados y no incrementarse en más de cuatro el número de subcultivos *in vitro*.

4.2.4 Susceptibilidad de suspensiones miceliales de *Pseudocercospora fijiensis* a sustancias antimicrobianas

Se logró determinar la MCI de la Higromicina B y del Carbendazim frente a los aislados de *P. fijiensis* mediante el método de dilución en agar utilizando como inóculo suspensiones miceliales.

La MCI de Higromicina B para el 66.6% de los aislados fue de 4 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ y para el 100% de los aislados se halló en valores menores e iguales a 8 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (tabla 5).

Tabla 5. Mínima Concentración Inhibitoria de Higromicina B y Cabendazim en medio de cultivo PDA frente a nueve aislados de *P. fijiensis* (concentración de inóculo de 2×10^5 ufc. ml^{-1} de suspensión micelial) después de cinco días de incubación a 28°C.

Aislado	Mínima Concentración Inhibitoria ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	
	Higromicina B	Carbendazim
CCIBP- 39 ¹	4	0.0625
CCIBP- 34 ²	4	0.125
CCIBP-64 ²	4	0.125
CCIBP- 54 ³	8	0.125
CCIBP-66 ³	4	0.125
CCIBP-57 ⁴	4	>32.0
CCIBP-110 ⁴	4	0.125
CCIBP-80 ⁵	2	0.0625
CCIBP-83 ⁵	8	0.0625

¹ Remedios, ² Sto. Domingo, ³ Vueltas, ⁴ Ciego de Avila, ⁵ Santa. Clara

Las MCI del carbendazim para el 90% de los aislados se encontraron en valores menores e iguales a $0.125 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Sin embargo, el aislado de Ciego de Ávila (CCIBP-57) no pudo ser inhibido a las concentraciones ensayadas. El mismo se obtuvo en "La Cuba", una plantación comercial de *Musa* spp. donde los programas de aplicación de fungicidas son comúnmente utilizados. Este resultado pudiera contribuir a estudios posteriores para la definición de aislados de *P. fijiensis* sensibles/resistentes a dicha sustancia antifúngica. Además, este criterio tiene gran importancia para estudios de interacción hospedero-patógeno donde se utilice como herramienta fundamental la transformación genética del patógeno.

Diferentes especies del género *Mycosphaerella* se han transformado y en los protocolos usados se ha empleado como agente de selección la Higromicina B, por ejemplo, *M. graminicola* (Payne *et al.*, 1998), *M. fijiensis*, *M. musicola* y *M. eumusae* (Balint-Kurti *et al.*, 2001). Por otra parte, el carbendazim ha sido utilizado también como agente de selección en la transformación genética de *Mycosphaerella* spp. (Payne *et al.*, 1998). La determinación o el conocimiento de las MCI de estos compuestos frente a diferentes aislados de es crucial importancia para tales fines.

Por ejemplo, el conocer que la Mínima Concentración Inhibitoria de Higromicina B para aislados de *P. fijiensis*, procedentes diferentes localidades está por debajo de $8 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, permite adicionar el agente de selección a concentraciones superiores al valor de la MCI y no arbitrariamente como frecuentemente se encuentra referido en la literatura. Además, permite en cuanto a las concentraciones del agente de selección, establecer protocolos generales de trabajo para la transformación de este patógeno y evitar escapes.

El carbendazim (bencimidazol 2-il carbamato de metilo) es el componente activo de varios fungicidas sistémicos entre los que se encuentra el Benomil y están agrupados dentro de los benzimidazoles. Grupo este que es considerado de alto riesgo debido al creciente desarrollo de aislados resistentes. En Cuba no se recomiendan más de dos tratamientos por año de estos productos. Pérez (1996) consideró los aislados resistentes como extremadamente competitivos y que eran frecuentes después de no utilizar los benzimidazoles por varios años. En el año 1995 en Costa Rica, se encontraron altos niveles de resistencia al benomil después de tres años que se había retirado este producto de los programas de control (Romero y Sutton, 1998).

Un aspecto a destacar en los resultados obtenidos es que los aislados CCIBP-57 y CCIBP-110 aún teniendo un mismo origen geográfico ("La Cuba" en Ciego de Ávila) mostraron respuestas diferenciales en cuanto a susceptibilidad al carbendazim. Esto concuerda con los

planteado por Marín *et al.* (2003) quienes plantean la persistencia de aislados individuales resistentes a benzimidazoles dentro de las poblaciones de *P. fijiensis*.

El carbendazim como ingrediente activo es un polvo gris y la mayor dificultad radica en su escasa solubilidad en agua. Este problema queda solucionado al presentarse en forma de complejo con una β -ciclodextrina la cual es un derivado de la descomposición parcial del almidón. Esto permite lograr una mayor homogeneidad del compuesto dentro de los medios de cultivo por lo que pudiera ser empleado el Complejo Carbendazim- β -ciclodextrina en sustitución del carbendazim en los estudios de transformación genética como agente de selección.

La determinación de la MCI utilizando suspensiones miceliales como inóculo y no discos de micelio (como tradicionalmente se recomienda para otros hongos filamentosos, Hanson *et al.*, 1996), permitió minimizar la dificultad que representa el crecimiento extremadamente lento de este patógeno en medios de cultivo sólido. Además, constituye una alternativa al uso de conidios como inóculo. Según Romero y Sutton (1997^a) la producción de éstos en *P. fijiensis* es un factor limitante para los ensayos de susceptibilidad ya sea por el bajo número de conidios que se obtienen o por la incapacidad de producirlos por algunos aislados.

4.3 Patogenicidad de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* sobre cultivares de *Musa*

Las suspensiones miceliales de los cuatro aislados de *Pseudocercospora fijiensis* produjeron síntomas sobre las hojas inoculadas en cuatro cultivares de *Musa*. Esto demostró su patogenicidad y la posibilidad de usarlos en programas de mejoramiento genético de *Musa* para la resistencia a *P. fijiensis*.

Los síntomas se correspondieron aproximadamente con los descritos por Mourichon *et al.* (1987) para plantas obtenidas *in vitro* inoculadas con conidios y para los referidos por Leiva *et al.* (2002) y Alvarado *et al.* (2003) con suspensiones miceliales (figura 11). Los mismos comenzaron a aparecer en la evaluación de los 14 días después de inoculadas las plantas en todos los cultivares.

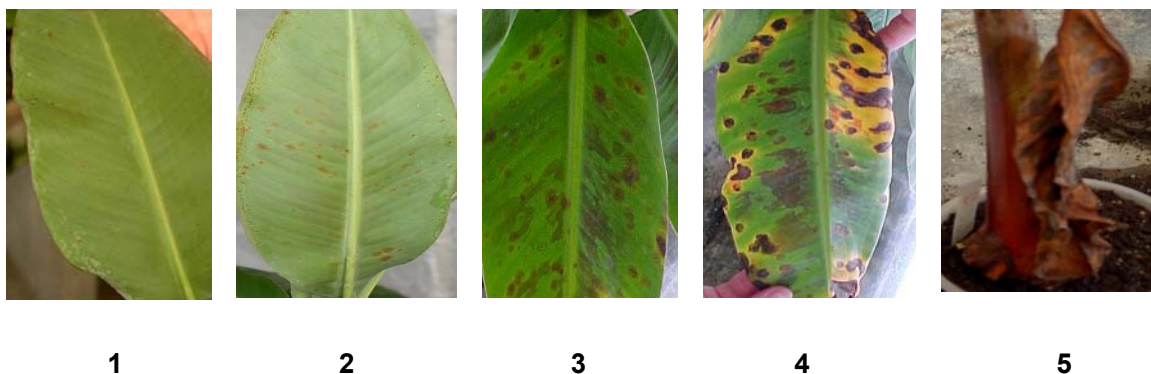


Figura 11. Diferentes estados de los síntomas encontrados en plantas de Grande naine obtenidas *in vitro* inoculadas con suspensiones miceliales del aislado CCIBP-57 en condiciones de casa de cultivo según la escala propuesta por Alvarado *et al.*, 2003).

Sin embargo, en cuanto al período de incubación de la enfermedad se han hallado diferencias dentro de un mismo cultivar las cuales han sido achacadas únicamente a las condiciones de humedad imperantes después de inoculadas las plantas (Hernández, 1995).

En el cultivar Grande naine a los 21 días predominaba el estado 1 para todos los aislados. No obstante, el período de evolución de los síntomas fue diferente entre estos. Los aislados CCIBP-39 y CCIBP-57 a los 35 días alcanzaron el estado 3, a los 56 días el estado 4 y a los 63 días el estado 5. Sin embargo, los aislados CCIBP-1 y CCIBP-110 evolucionaron muy lentamente, solo a los 56 días de inoculación llegaron al estado 3 y no lo sobrepasaron. Estos resultados demostraron la diferencia de virulencia entre estos aislados de *P. fijiensis* (figura 12-A) sobre dicho cultivar.

En el cultivar Niyarma Yik los aislados CCIBP-1 y CCIBP-39 mostraron un comportamiento similar al observado en Grande naine. Sin embargo, el aislado CCIBP-110 ya a los 35 días se encontraba en estado 3, el cual evolucionó en los siguientes 21 días a los estados 4 y 5. El aislado CCIBP-57 llegó al estado 4 a los 63 días de evaluación (figura 12-B).

Las diferencias de comportamiento de los aislados de *P. fijiensis* en su interacción con cultivares de *Musa* ha sido referida por otros autores en ensayos similares. Por ejemplo: Fullerton y Olsen (1995) encontraron diferentes patrones de patogenicidad en aislados del Sureste de Asia sobre varios genotipos. Ello es indicativo de la heterogeneidad de este patógeno en cuanto a su virulencia. Otros autores refieren igual comportamiento dentro de poblaciones de patógenos fúngicos, por ejemplo *Alternaria solani* Sor. en tomate (Pérez, 2003) y *Diaporthe phaseolorum* en trigo (Pioli *et al.*, 2003).

Se pudo constatar, además, que la virulencia de los aislados sobre los cultivares susceptibles (Grande naine y Niyarma yik) no estuvo relacionada con el origen de

aislamiento de los mismos. De los dos de Remedios (pequeña parcela) uno fue más virulento que el otro y de igual forma los obtenidos de Ciego de Ávila (plantación comercial). Esto corrobora la hipótesis sobre la alta variabilidad a que esta sujeta *P. fijiensis* (Mourichon, 1995, Carlier *et al.*, 2000) y coincide con lo encontrado por Muller *et al.* (1997) al comparar genéticamente aislados *P. fijiensis* procedentes de una misma lesión.

El aislado CCIBP-1 no logró alcanzar a los 63 días de inoculado, el estado 3 de los síntomas sobre los cultivares susceptibles (Grande naine, Niyarma Yik), sin embargo, Leiva *et al.* (2002) al inocular artificialmente una suspensión micelial de este aislado sobre el cultivar Grande naine bajo condiciones similares logró alcanzar a las ocho semanas de inoculación el estado 5 en este cultivar. Al comparar estos resultados, se puso de manifiesto la pérdida de virulencia de este aislado, propiciado quizás, por el número de subcultivos *in vitro* (16 subcultivos). Según Stover (1976), la virulencia al igual que la capacidad de esporulación se pierde con facilidad en el cultivo *in vitro*.

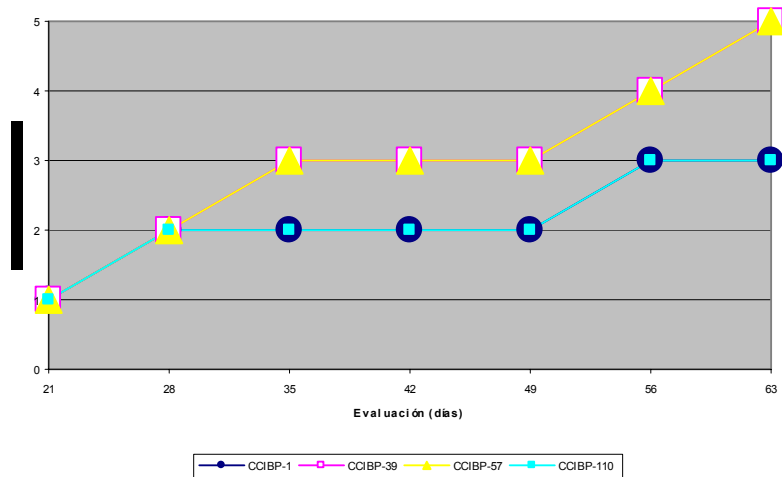
En el cultivar FHIA-18, el estado 1 predominó a los 21 días, excepto para el aislado CCIBP-1 que lo alcanzó a los 28 días. Posteriormente ningún aislado sobrepasó el estado 2 hasta los 63 días de evaluación (figura 12-C). Similar comportamiento fue encontrado por otros autores para los genotipos de la FHIA. Por ejemplo, Romero y Sutton (1997^a), encontraron un lento progreso de la enfermedad en los genotipos FHIA-01y FHIA-02 en ausencia de interacciones aislados-genotipos y Leiva *et al.* (2002) y Alvarado *et al.* (2003) al evaluar *P. fijiensis* sobre plantas del cultivar FHIA-18 alcanzaron a los 60 días solo el estado 3.

En el cultivar Calcutta 4 se alargó en 15 días el periodo entre el estado 1 y 2 con respecto al FHIA 18. No obstante, el comportamiento de los aislados, en cuanto al estado máximo de los síntomas alcanzado, fue similar, pues estos no evolucionaron a los estados 3, 4 y 5 (figura 12-D). El aislado CCIBP-110 fue el primero en llegar al estado 2 (42 días). Excepto el CCIBP-57 que se mantuvo en estado 1, el resto de los aislados desde los 49 y hasta los 63 días se encontraron en estado 2.

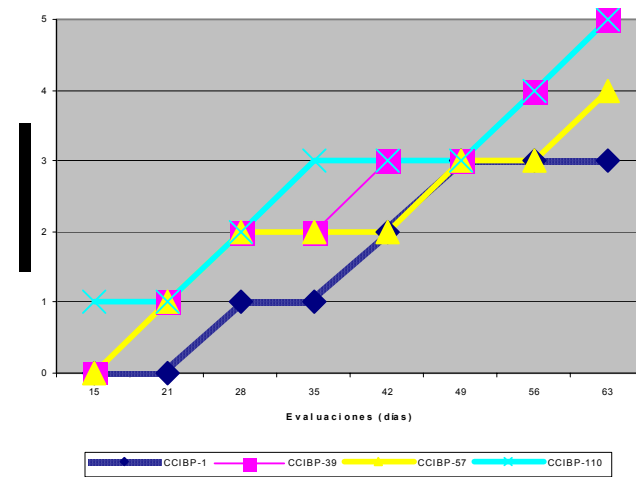
Se encontraron diferencias en la virulencia entre los aislados de *P. fijiensis*, independiente del lugar de procedencia, sobre genotipos de *Musa* inoculados artificialmente utilizando como inóculo suspensiones miceliales. Los resultados alcanzados indicaron que existió interrelación entre los genotipos y los aislados. De forma general un mismo aislado puede comportarse de manera distinta, dependiendo del nivel de resistencia que tenga el genotipo hospedante, y en consecuencia, cada genotipo puede ser más o menos afectado, en dependencia de la virulencia de los aislado. Estos resultados corroboraron la importancia de evaluar la virulencia de aislados de *P. fijiensis* que vayan a ser utilizados para la selección

temprana de genotipos de *Musa* en programas de mejoramiento genético, específicamente en los cultivares de interés.

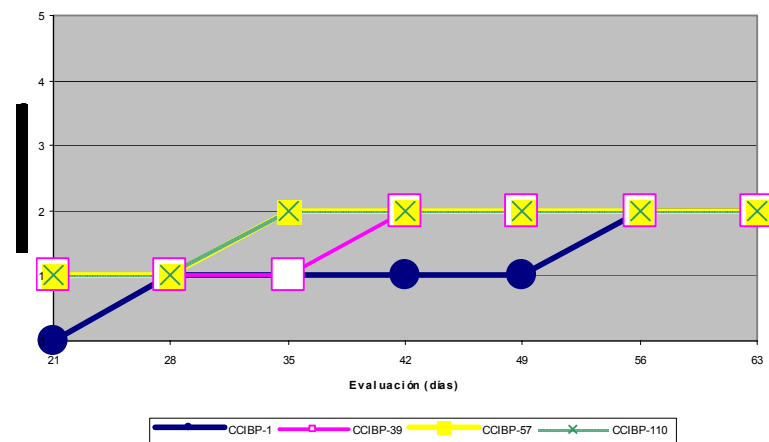
Se constató en condiciones de casa de cultivo el comportamiento en campo de los cultivares estudiados en cuanto a sus patrones de resistencia/susceptibilidad frente a *M. fijiensis*.



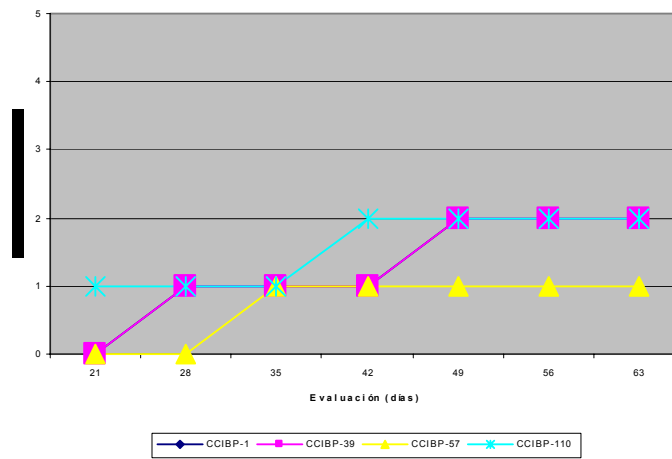
A



B



C



D

Figura 12 Desarrollo de los síntomas durante el período de evaluación de cuatro cultivares de Musa inoculados artificialmente con suspensiones miceliales de los diferentes aislados de *P. fijiensis*. (A-Grande naine (susceptible), B- Niyarma Yik (susceptible), C-FHIA-18 (parcialmente resistente, D- Calcutta 4 (resistente))

5. Conclusiones

1. Se obtuvieron nueve aislados de *Pseudocercospora fijiensis* procedentes de pequeñas parcelas de Santa Clara, Vueltas, Santo Domingo, Remedios y de Ciego de Ávila en la Empresa de cultivos varios "La Cuba". Sus características culturales y morfológicas coincidieron con las referidas en la literatura científica para esta especie.
2. Se demostró que el crecimiento de los aislados de *P. fijiensis* en medio de cultivo líquido estuvo influenciado por la composición de los mismos. El Extracto de Malta resultó el más favorable para el crecimiento del micelio.
3. Se comprobó que la producción de conidios *in vitro* de aislados de *P. fijiensis* disminuyó con el incremento del número de subcultivos y que esta fue independiente del aislado.
4. Fue posible determinar la MCI de Higromicina B y Carbendazim frente a aislados de *P. fijiensis* con el método de dilución en agar utilizando como inóculo suspensiones miceliales.
5. Se comprobó la variabilidad de los aislados de *P. fijiensis* en cuanto a la velocidad de crecimiento en PDA, crecimiento en M1-D (peso seco), características morfológicas de las estructuras de reproducción asexuales, susceptibilidad a la Higromicina B y al Carbendazim y que esta fue independiente del lugar de procedencia de los mismos.
6. Se comprobó la patogenicidad de aislados de *P. fijiensis* sobre genotipos de *Musa* inoculados artificialmente con suspensiones miceliales y se encontraron diferencias en cuanto a su virulencia.

6. Recomendaciones

1. Realizar estudios donde se incluyan diferentes medios de cultivo micológicos en estado sólido con el interés de evaluar el crecimiento de *Pseudocercospora fijiensis*.
2. Evaluar la producción de metabolitos fitotóxicos de los aislados CCIBP-39, CCIBP-34, CCIBP-64, CCIBP-54, CCIBP-66, CCIBP-57, CCIBP-110, CCIBP-80 y CCIBP-83 en medio de cultivo M1-D.
3. Evaluar el medio de cultivo Agar Extracto de Malta para la producción de conidios *in vitro* de *P. fijiensis*.
4. Comparar el micelio producido en Extracto de Malta y V-8 para la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Pseudocercospora fijiensis* sobre cultivares de *Musa*.
5. Evaluar el efecto del número de subcultivos y el tiempo de cultivo *in vitro* sobre la virulencia de los aislados de *P. fijiensis*.
6. Realizar estudios de patogenicidad a un mayor número de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* e incluir más cultivares de *Musa* para establecer una escala de grados de virulencia, utilizando como inóculo suspensiones miceliales.

7. Referencias Bibliográficas

- Adaskaveg, J y Hartin R (1997) Characterization of *Colletotrichum* isolates, causing anthracnose of Almond and Peach in California. *Phytopathology* 87: 979-987
- Alvarado C. Y., Leiva M. M., Rodríguez M. A., Acosta M., Cruz M. M., Portal N., Kosky, G. R., García L., Bermúdez I., Padrón J. (2003). Early evaluation of Black leaf streak resistance on *Musa* spp. breeding program by the use of mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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.pp 169-175
- Balint-Kurti, P, May G y Churchill A (2001) Development of transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana. *FEMS Microbiology Letters* 195.pp 9-15
- Carlier, J , Lebrun M, Zapater M, Dubois C y Mourichon X (1996) Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, vol. 5, pp 499-510.
- Carlier, J, De Waele D y Escalant JV (2002) Global evaluation of *Musa* germplasm for resistance to *Fusarium* wilt, *Mycosphaerella* leaf spot diseases and nematodes.(A. Vézina y C.Picq, eds). INIBAP Technical Guidelines 6.The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. INIBAP ISBN: 2-910810-52-6
- Carlier, J, Fouré E, Gauhl F, Jones D, Lepoivre P, Mourichon X, Pasberg-Gauhl C y Romero R (2000) Black Leaf Streak. En: Jones, D (Ed.) *Fungal Disease of the Foliage*. Cap. 2, pp 37-79.
- Carlier, J, Hayden H, Rivas G, Zapater M, Abadie C y Aitken E (2003) Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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.pp 123-130
- Carlier, J, Mourichon X, González D, Zapater M y Lapeyre F (1994) DNA restriction fragment length polymorphism in *Mycosphaerella fijiensis* that cause banana leaf spot disease. *Phytopathology*. 84: 751-756
- Cedeño, L, Carrero C y Quintero K (2000) Identificación de *Mycosphaerella fijiensis* como causa de "pecas" en frutos de plátano cv. Hartón en Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, Vol 13, No. 1. pp 6-10.

- Chandler, S (1995) The nutritional value of banana. En: Gowen, S (Ed) Bananas and plantains. London, Chapman y Hall. pp. 468-480
- Conde Ferráez, I, Rodríguez CM, Perez L y James A (2003) Molecular karyotype of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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. pp. 141-146
- Cote, F, Domerque R, Monmarson S, Schwendiman J, Teisson C y Escalant J (1996) Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand naine. *Physiol. Plant* 97:285-290.
- Craenen, K, Ortiz R, Karamura E y Vuylsteke D (Eds) (2000) Proceeding of the first International conference on Banana and Plantain for Africa. *Acta Horticulturae*. Pp. 540-588.
- Crous, PW, Groenewald J, Aptroot A, Braun U, Mourichon X y Carlier J (2003) Interacting morphological and molecular data sets in *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on *Musa*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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. Pp 43-58
- Daniel, D, Gómez R y Reyes M (2002) Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the Hybrid cultivar FHIA-21 (*Musa* sp. AAAB Group). *In vitro Cell*. Pp. 1-5
- Daniels, D (1999) Micropropagación del Clon de Plátano Híbrido FHIA-21 (AAAB) y sus somaclones. Tesis para optar por el Grado Científico de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. pp 64
- De Langhe, E (1996) Banana and plantain: The earliest fruit crop? En: INIBAP Annual Report, 1995. Montpellier, France, INIBAP. Pp. 6-8.
- Edel, V, Steinberg, C, Gautheron N y Alabouvette C (1996) Evaluación of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the *Fusarium* species. *Mycol. Res.* 100(2): 179-187.
- Fagan, H, Fouré E, Mourichon X, Pires de Mato A, Romero R, Tripon S y Vi Nai P (1997) Scope of work, priority research needs and mayor constraints. Sigatoka disease working group. En: Frison, E, Orjeda G y Sharrock S (Eds.) Proceedings of meeting held in Gosier, Guadeloupe. International network for the improvement of banana and plantain.
- FAO (2002). <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture&language=ES>

- Fouré, E (1982) Les Cercosporiose du bananier et leur traitemant. Comportement des varietés. Estude de la sensibilité varietale des bananiers et plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladies de raises noires). I Incubation et evolution de la maladie. II Etude de quelques parametres. Fruits 37 (12) : 749-754.
- Fouré, E (1987) Varietal reaction of bananas and plantains to Black leaf streak disease. En: Persley, G y De Langhe G (eds) Banana and plantain breeding strategies. Proceedings of an International workshop held in Cairns, Australia.pp 110-113.
- Frison, E, Orjeda G y Sharrock S (eds.) (1997) Proceedings of meeting held in Gosier, Guadeloupe. International network for the improvement of banana and plantain.
- Fullerton R.A. & T.L. Olsen.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
- Ganapathi, C, Srinivas L, Suprasanna P y Bapat V (2001) Regeneration of plants from alginate-encapsulated somatic embryos of banana cv. Rasthali (*Musa* spp. AAB group). In vitro cell. 37: 178-181.
- Ganry, J y Laville E (1983) Les cercosporioses du bananier et leur traitement. 1. Traitements fungicides. 2. Advertissement. Fruit 38: 3-20.
- García, L, Herrera L, Bermúdez I, Veitía N, Clavelo J, Acosta M y Romero C (1997) Metodología para la selección *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en banano. INFOMUSA, Vol.6, no.1, pp. 14-15
- Gauhl, F (1994) Epidemiology and ecology of black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain and banana (*Musa* spp.) in Costa Rica, Central America. INIBAP, Mompellier, France.
- Goméz, R, de Feria M, Posada L, Gilliard T, Bernal F, Reyes M, Chávez M y Quiala E (2002) Somatic embryogenesis of banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. Plant Cell Tissue and Organ Culture 68: 21-26.
- Hanson, L, Schwager S y Loria R (1996) Sensivity to Thiabendazole in *Fusarium* species associated with Dry Rot of Potato. Phytopathology. Vol. 86, No. 4, pp. 378-383.
- Hernández, R (1995) Selección *in vitro* e invernadero de clones de *Musa* sp. para la evaluación de su resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Tesis en opción del grado científico de Magister scientiae. CATIE. pp 97.
- IAEA. 2002. http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/004/Y1799e.HTM#P16_197
- Jácome, L (2003) Population biology and epidemiology. En: Jácome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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.pp. 107-110.

- Jácome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant V (2003) *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.
- Jácome, L y Schuh (1993) Effect of temperature on growth and conidial production *in vitro*, and comparison of infection and aggressiveness *in vivo* among isolates of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Trop. Agric. 70: 51-59
- Jain, M (2002) Informe sumario de la Cuarta Reunion final de investigaciones coordinadas de FAO/IAEA sobre la Biología celular y biotecnología incluyendo técnicas de mutación para la creación de nuevos genotipos útiles de banano. Infomusa Vol. 11, No. 1, pp. 14-15
- Jeger, M, Eden-Green S, Tres J, Johanson J, Waller J y Brown A (1995) Banana disease. En: Gowen, S (ed) Banana and Plantain. Chapman & Hall. London. Pp 343- 356.
- Johanson, A (1995) Detection of banana leaf spot pathogens by PCR. Bulletin OEPP/OPPO No. 25, pp. 99-107.
- Jones, D (2003) The distribution and importance of *Mycosphaerella* leaf spot disease of banana. En: Jácome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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. pp.25-42
- Kodyn, A y Zapata F (1999) Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. Grande naine). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 55. pp. 141-145.
- Leach, R (1964) Report on investigations into the cause and control of the new banana disease in Fiji, black leaf streak. Coun. Pap. Fiji. No. 38
- Leiva, M (1998) Estudio de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet para la diferenciación de genotipos de *Musa* spp. en invernadero. Trabajo de Diploma. UCLV, Cuba. pp. 35
- Leiva, M, Dita M, Alvarado C, Acosta M, García L y Bermúdez I (2002) Empleo dde diferentes inóculos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de invernadero para evaluar el comportamiento de dos cultivares de banano. INFOMUSA. Vol 11, No. 2. pp. 41-42.
- Ma, S y Shii C (1972) En J. Chinese Soc. Hort Sci, 18. pp. 135-142.
- Manzo, G, Orozco M y Guzmán S (2001) Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios de cultivo líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología. pp. 66-71
- Marín, D y Romero R (1992) El combate de la Sigatoka negra. Boletín No. 4, Departamentote Investigaciones, Corporación Bananera Nacional. Costa Rica.

- Marín, D, Romero R, Guzmán M y Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant disease*, Vol 87, No 3, pp. 208-222.
- Marín, D, Sutton T y Barrer (2002) Diseminación del banano en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. No. 66, pp. 62-75.
- Marín, DH, Ching L y Romero R (1992) Efecto de la Sigatoka negra sobre la productividad del plátano. En: Corporación Bananera Nacional - Informe Anual 1991. San José. Costa Rica. Pp. 85-86
- Mc. Donald, B y Martínez J (1991) Chromosome length polymorphisms in *Septoria tritici* population. *Current Genetic* 19: 265-271.
- Meredith D.S & Lawrence, J.S (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52 (3): 459-476
- Miller, P (1955) V-8 juice agar as general-purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* 45: 461-462
- Mobambo, K, Gauhl R, Swennen R y Pasberg-Gauhl C (1996) Assessment of the cropping cycle effects on black leaf streak severity and yield decline of plantain and plantain hybrids. *International Journal of Pest Management*. 42: 1-7
- Mouliom-Pefoura, A y Mourichon X (1990) Développement de *Mycosphaerella musicola* (maladie de Sigatoka) et *M. fijiensis* (maladie des raies noires) sur les bananiers et plantain. Etude du cas particulier des productions d'altitude. *Fruits* 45: 17-24
- Mourichon, X, Lepoivre P y Carlier J (2000) Host-Patogen interacción. En: Jones, D (Ed.) *Fungal Disease of the Foliage*. Cap. 2, pp 67-72
- Mourichon, X (2003) Overview of progress and results since the first international workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease of banana in 1989. En: Jácome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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*. pp.11-18
- Mourichon, X y Fullerton R (1990) Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) y *M. fijiensis* Morelet (*Cercospora fijiensis*), respectively agent of Sigatoka disease and Black Streak Disease in bananas and plantains. *Fruits* 45: 213-218.
- Mourichon, X, Peter D, Zapater M (1987) Inoculation experimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur jeunes plantules de bananier issues de culture *in vitro*. *Fruit*. 45. No. 4. pp. 195-198.

- Mourichon, X, Zapater M y Bivigou Y (1990) Obtention in vitro du stade *Mycosphaerella fijiensis*, form parfaite de *Cercospora fijiensis*. Fruits 45: 553-557.
- Mulder, J y Stover R (1976) *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. Trans. Br. Mycol. Soc. 67: 77-82.
- Muller, R, Pasberg-Gaulhp C, Gauhl F, Ramser J y Kahl G (1997) Oligonucleotide Fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigerian *Mycosphaerella fijiensis*. J. Phytopatology 145. pp 25-30.
- Murk, E, Phaff H y Douglas H (1942) A sporulation stock medium for yeast and other fungi. Science 96: 432
- MusaDoc, (2000) Internacional Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP). Parc Scientifique Agropolis. Montpellier, Francia. Disco compacto. ISBN: 2-910810-39-9
- Novak, F, Van Duren (1989) Mutagénesis *in vitro* para el mejoramiento genético del banano y el plátano (*Musa* spp.). Informe Mensual 88-89. Panamá. UPEB. pp 61-80
- Okole, B y Schulz F (1997) Selection of *Mycosphaerella fijiensis*- resistant cell lines from micro-cross selection of banana and plantain. Plant cell Reports. Vol. 16, pp 339-343.
- Okole, BN (1995) Selection of banana and plantain (*Musa* spp.) tissue resistant to toxins produced by *Mycosphaerella* species using tissue culture techniques. PhD. Dissertation, Humboldt University, Germany.
- Orellana, P (1998) Introducción a la propagación masiva. En: Pérez, P(Ed) Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Pp. 125-133.
- Pasberg-Gauhl, C, Gauhl F y Jones D (2000) Fungal disease of foliage. Sigatoka leaf spots. Black leaf streak. Distribution and economic importance. En: Jones, D (ed) Disease of banana, abaca and enset. CABI, Publishing. Pp. 37-44.
- Payne, A, Grosjean, M y Hollomon D (1998) Transformation of the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* to carbendazim and hygromycin B resistance. Curr. Genet 34: 100-104.
- Pereira, B, Finalet J, Pino B e Miranda I (2001) Preliminar molecular characterization of *Mycosphaerella fijiensis*. Protección Vegetal, vol. 16, No. 2-3. pp. 102-106.
- Pérez, L (1996) Manual para el manejo integrado de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder) en bananos y plátanos. Proyecto TCP/CUB/4454. Control de la Sigatoka negra del banano y del plátano 45
- Pérez, L, Alvarez J y Pérez M (2003) Economic impact and management of black leaf streak disease in Cuba. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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. pp. 71-84
- Pérez, P (Ed) (1998) Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Pérez, S (2003) Variabilidad cultural, patogénica y genética del agente causal del Tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Cuba. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de la Habana.
- Pinkerton, F y G Strobel (1976) Proc of the National Academy of Science, USA. 74:4007-4011.
- Pioli, R, Morandi E, Martínez M, Lucca F, Tozzini A, Bisaro V y Hopp E (2003) Morphologic, Molecular, and Pathogenic Characterization of *Diaporthe phaseolorum*. Variability in the Core Soybean-Producing Area of Argentina. Phytopathology. APSnet. Plant pathology online.
- Pons, N (1990) Taxonomy of *Cercospora* and related genera. En: Fullerton, R y Stover R (eds) Sigatoka leaf spot diseases of bananas: Proceedings of an International Workshop held at San José, Costa Rica, pp. 360-370.
- Rao, P, Ganapathi C, Suprasanna P y Bapat V (1993) Encapsulated shoot tips of banana: a new propagation and delivery system. INFOMUSA 2. 2. pp. 4-5
- Rhodes, P (1964) A new banana disease in Fiji. Comn. Phytopathol. News 10: 38-40.
- Rivas, G, Zapater M y Carlier J (2003) Genetic differentiation between *Mycosphaerella fijiensis* population in Latin America and the Caribbean. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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.
- Robinson, JC (1996) Bananas and Plantains. CAB International. Wallingford, UK
- Rojas, M (1998) Estudio del comportamiento *in vitro* de diferentes aislados de *Alternaria solani* Sor. Tesis de grado. Instituto Politécnico Lázaro Cárdenas. Cuba. pp 39
- Romero, R (2000) Control. Host-Pathogen interacción. En: Jones, D (Ed.) Fungal Disease of the Foliage. Cap. 2, pp 72-75.
- Romero, RA y Sutton TB (1997^a) Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka of Banana, to propiconazole. Disease control and pest management. Phytopathology. pp. 96-98.

- Romero, RA y Sutton TB (1997^b) Reacción of tour *Musa* genotypes at three temperaturas to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. Plant disease. pp. 1139-1142.
- Romero, RA y Sutton TB (1998) Characterization of Benomyl Resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, Cause of Black Sigatoka of Banana, in Costa Rica. Plant Disease. Vol. 82, Number 8
- Roux, N, Toloza A, Busogoro j, Panis B, Strosse H, Lepoivre P, Swennen R y Zapata F (2003) Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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. pp 239-250.
- Rutter, J, Burt P y Ramírez F (1998) Movement of *Mycosphaerella fijiensis* spores and Sigatoka disease development on plantain close to an inoculum source. Aerobiología. 14: 201-208.
- Stierle, A, Upadhyay R, Hershenhorn J, Strobel G y Molina G (1991) The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of black sigatoka disease of bananas and plantains. Experientia 47. pp. 853-859
- Stover, R (1980) Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. Plant Diseases repoter 64(8): 750-758
- Stover, R (1974) Effect of measured levels of Sigatoka disease of banana on fruit quality and leaf senescence. Trop. Agric. 51: 531-542.
- Stover, R (1976) Distribution and cultural characteristics of the pathogen causing banana leaf spot. Tropical Agriculture (Trinidad) 53: 111-114.
- Stover, R (1977) Behavior of Benomyl tolerant strain of Black Sigatoka pathogen in the field. Proc. Arm. Phytopahol. Soc.4. pp 180-181
- Stover, R y Simmonds N (1987) Bananas. 3rd ed. Longman Scientific & Technical. Essex, England.
- Swennen , R, Arinaitwe, G, Cammue B, Francois I, Panis B, Sági L , Santos E, Strosse H y Van Den Houwe I (2003) Transgenic approaches for resitance to *Mycosphaerella* leaf spot disease in *Musa* spp. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y 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. pp 209-238.

- Upadhayay, R, Strobel G y Coval S (1990) Some toxins of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Sigatoka leaf spot diseases of bananas proceedings of an International Network for the improvement of banana and plantain (INIBAP), San José, Costa Rica. pp 225-236.
- Ventura, J, Mener V, López J, García M, Rodríguez S, García J y Reynaldo D (1998) Manejo de los explantes en inmersión temporal, clon de banano FHIA-18. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones de la Habana. FAO. Cuba. Pp. 64.
- Vidal, A (1992) Sigatoka negra en Cuba. En: Nuevos Focos y plagas y enfermedades. Boletín Fitosanitario de la FAO. 40: 1-2.
- Vulsteke, D (1989) Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Practical manual for handling crop germplasm *in vitro*. 2 Rome: International Board for Plant Genetic Resource.
- Zhan, J, Mundt C y McDonald B (2001) Using Restriction Fragment length Polymorphisms to Assess Temporal Variation and estimate the number of ascospores that initiate epidemics in Field populations of *Mycosphaerella graminicola*. Phytopatology. Vol 91, No. 10. pp 1011-1017.

Anexo 1. Aislados obtenidos de *Pseudocercospora fijiensis* procedentes de diferentes localidades de la Provincia de Villa Clara y de la Empresa "La Cuba" en Ciego de Ávila.

Aislados	Localidad
CCIBP- 39	Remedios
CCIBP- 34	Santo Domingo
CCIBP- 64	Santo Domingo
CCIBP- 54	Vueltas
CCIBP- 66	Vueltas
CCIBP- 57	Ciego de Ávila
CCIBP- 110	Ciego de Ávila
CCIBP- 80	Santa Clara
CCIBP- 83	Santa Clara

Anexo 2. Concentración de conidios producido por aislados de *P. fijiensis* a los 25 días de incubación (20°C y luz fluorescente)

Subcultivos	Aislados	Concentración conidios. ml ⁻¹ (10 ⁵)
1	CCIBP-34 ²	10.83 a
	CCIBP-66 ³	14.66 a
4	CCIBP-39 ¹	6.00 b
	CCIBP-57 ⁴	7.83 b
8	CCIBP-54 ³	1.08 c
	CCIBP-64 ²	2.16 c
E.E		± 0.61

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según Dunnett's C para $P \leq 0.05$. ¹ Remedios, ² Santo. Domingo, ³ Vueltas, ⁴ Ciego de Ávila,