

Dedicatoria

A mis queridos padres Bernardo y Francisca, por todo su amor, apoyo en los momentos más difíciles y por sus palabras de aliento para seguir adelante en todo momento.

A mis hermanos Bernardo, Oscar y Bernardo Luis, por su inmenso cariño, muestras de afecto y darme ánimos para alcanzar esta meta tan importante en mi carrera profesional.

A mi preciosa sobrina Daniela Lucia, por llenarme de felicidad con su llegada.

Agradecimiento

Al Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), por el apoyo económico e institucional en la realización de esta investigación.

Al proyecto de desarrollo de cultivares de plátano resistentes a Sigatoka negra para América Latina BID/IICA-FONTAGRO/INIBAP-CATIE, por la cooperación técnica y apoyo financiero en la realización de esta investigación.

En forma especial, a mi profesora consejera PhD. Alba Stella Riveros, por su valioso apoyo, orientación, confianza y amistad. Gracias por el tiempo dedicado a la realización de este trabajo de investigación.

A los miembros del comité asesor: PhD. Vera Sánchez, PhD. Gónzalo Galileo Rivas, PhD. Luis E. Pocasangre y PhD. Franklin E. Rosales, por su ayuda y valiosas observaciones en todas las etapas de esta investigación.

A todo el personal de MIP/ CATIE, M.Sc. Eduardo Hidalgo, Claudio, Jhonny, Armando y Martjin, por su cooperación, amistad y darme ánimos para culminar satisfactoriamente mi trabajo.

Al personal del laboratorio de nutrición animal/CATIE, Frank y Charlie, por su amistad y ayuda brindada en la preparación de parte del material requerido para esta investigación.

A mis compañeros y amigos, Viodelda, Diana, Neidy, Paola, Víctor y Alexis, por su amistad y apoyo en los años que hemos compartido juntos en CATIE.

A mis amigos de siempre, Blas y Karyne, por su amistad incondicional, ya que ni el tiempo ni la distancia han logrado romper los lazos de amistad que siempre nos han unido y hacer de cada visita a casa, un momento inolvidable.

Gracias a todos lo que de alguna manera me brindaron su ayuda para alcanzar esta meta.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN	vii
SUMMARY	ix
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xiii
1. Introducción	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. General	3
1.1.2. Específicos	3
1.1.3. Hipótesis	3
2. Revisión de literatura	4
2.1. Aspectos generales del cultivo del plátano	4
2.2. Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet)	5
2.2.1. Distribución geográfica	5
2.2.2. Biología y ciclo de vida del patógeno	6
2.2.3. Síntomas de la enfermedad	8
2.2.4. Estructura genética de poblaciones de <i>M. fijiensis</i>	9
2.2.5. Métodos de control	10
2.3. Relación parasitaria <i>M. fijiensis</i> - <i>Musa</i>	14
2.3.1. Interacción incompatible-cultivar resistente	16
2.3.2. Interacción compatible: cultivar parcialmente resistente y susceptible	17
2.3.2.1. Cultivares parcialmente resistentes	17
2.3.2.2. Cultivares susceptibles	18
2.4. Técnicas de cultivo <i>in vitro</i> en la selección de resistencia a patógenos	18
2.4.1. Investigaciones realizadas sobre la relación parasitaria <i>Musa</i> - <i>M. fijiensis</i>	19
3. Materiales y métodos	22
3.1. Localización del estudio	22
3.2. Material vegetal experimental: variedades de plátano	22
3.2.1. Micropropagación, enraizamiento y aclimatación	22
3.2.2. Material fúngico <i>M. fijiensis</i>	22

3.3. Obtención de cultivos monospóricos de <i>M.fijiensis</i>	23
3.3.1. Preparación de la fracción cruda de <i>M. fijiensis</i> en germinación	24
3.3.2. Preparación de células del mesófilo a partir del tejido foliar de <i>Musáceas</i>	25
3.4. Método estándar	25
3.4.1. Método células del mesófilo del tejido foliar	27
4. Diseño Experimental	28
4.1. Modelo Matemático	28
4.1.1. Método estándar	28
4.1.2. Método células del mesófilo	29
5. Resultados y Discusión	31
5.1. Método estándar	31
5.1.1 Selección de la cepa costarricense de <i>M. fijiensis</i> con mayor nivel de virulencia a la Sigatoka negra	31
5.1.2. Evaluación rápida de resistencia a <i>M.fijiensis</i> (cepa Peralta)-vs- cultivares de plátano FHIA-21 y Curraré	36
5.2. Método células del mesófilo: evaluación temprana de resistencia a <i>M. fijiensis</i> (cepa Peralta) –vs- cultivares de plátano FHIA-21 y Curraré	40
5.3. Comparación de métodos para evaluar patogenicidad	45
6. Conclusiones y Recomendaciones	48
6.1. Conclusiones	48
6.2. Recomendaciones	49
7. Referencias bibliográficas	50
8. Anexos	57

Díaz Mejía, A.G. 2003. Desarrollo y evaluación de métodos para tamizado temprano de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, en Cultivares de Plátano.

Turrialba, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. CATIE. 66p.

Palabras claves: *Mycosphaerella fijiensis*, Sigatoka negra, pruebas de patogenicidad, inoculación, extracto crudo, susceptibilidad, resistencia, FHIA-21, Curraré, plátano.

Resumen

La Sigatoka negra, es considerada la enfermedad más limitante del cultivo de Musáceas, reduce el rendimiento y la productividad dentro de la plantación, genera costos elevados en productos químicos requeridos para su control, trayendo como consecuencia alta capacidad de mutación del patógeno.

Con el objetivo de desarrollar y evaluar metodologías para la identificación rápida de resistencia a la Sigatoka negra en cultivares de plátano, se realizaron pruebas de patogenicidad tanto en invernadero como *in vitro*. En condiciones controladas de invernadero, para la identificación de la cepa de *M. fijiensis* con mayor nivel de virulencia, se utilizó el método estándar sobre los cultivares de plátano FHIA-21 (resistente) y Curraré (susceptible), siguiendo la inoculación artificial de 10 cultivos monospóricos de *M.fijiensis*, provenientes de diferentes regiones de Costa Rica. La cepa seleccionada como virulenta fue utilizada tanto en la verificación del método estándar como en el método de células del mesófilo bajo condiciones *in vitro* sobre estos mismos cultivares. Este último método, requirió la extracción de la fracción cruda de *M.fijiensis* (FcMF) y el establecimiento de un gradiente de dilución de FcMf con incubación a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24, 48 y 72 horas.

Los resultados obtenidos, mediante el método estándar en la fase de selección de la cepa con mayor nivel de virulencia, mostraron el grado de resistencia diferencial entre los cultivares y el nivel de virulencia de las cepas analizadas. Se seleccionó la cepa Peralta para la realización de las posteriores pruebas de patogenicidad. En las pruebas realizadas, con la cepa Peralta mediante el método estándar, se observó el mismo comportamiento obtenido en la fase de selección, referente a su capacidad de diferenciación de niveles de resistencia, principalmente sobre los estomas penetrados con células de guarda necrosadas y el bloqueo en la evolución de los síntomas, alcanzando el estadio 2 de desarrollo de la enfermedad a los 15 días, sin presentar estadios avanzados de la enfermedad hasta el día 45 después de

la inoculación en el cultivar resistente FHIA-21. En el cultivar susceptible Curraré, no se observó la presencia de células de guarda necrosadas en etapas tempranas de la infección y las primeras lesiones correspondientes al estadio 2 de la enfermedad, aparecieron a los 30 días después de la inoculación, el tamaño de la lesión fue en aumento hasta el día 45 de evaluación, donde se presentaron etapas avanzadas de infección.

En las pruebas de selección temprana de resistencia *in vitro*, mediante la aplicación de las diferentes diluciones de FcMf sobre las células del mesófilo de los cultivares, se observó una pérdida progresiva del porcentaje de viabilidad a medida que aumentan la concentración y el tiempo de incubación con la FcMf. En el cultivar resistente FHIA-21, se encontró un mayor número de células muertas para todos los tratamientos y horas de lectura. Mientras que, el cultivar susceptible Curraré, mostró mayor cantidad de células con cloroplastos organizados anormalmente y alteración de la pared celular, a partir de las 24 horas de incubación con la FcMf para todos los tratamientos. En términos de consistencia, reproducibilidad y confiabilidad en los resultados se concluye que el método estándar se mantiene como el mejor frente al de células del mesófilo, este último es muy rápido pero, aun requiere de más estudios.

Díaz Mejía, A.G. 2003. Development and Evaluation for Early Resistance Selection to *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, in Plantain Cultivars. Turrialba, Costa Rica. M.S. Thesis. CATIE. 66p.

Key Words: *Mycosphaerella fijiensis*, Black Sigatoka, pathogenic tests, inoculation, crude extract, susceptibility, resistance, FHIA-21, Curraré, plantain.

SUMMARY

The Black Sigatoka is considered the most limiting disease in Musáceas crops. It reduces plantation yield and productivity; it also generates high costs of chemical products required for its control. As a consequence, there is a high pathogenic mutation capacity.

Pathogenic tests were done in a greenhouse as well as *in vitro* with the objective of developing and evaluating methodologies to rapidly identify the resistance of the Black Sigatoka in plantain cultivars. In controlled greenhouse conditions, standard methods for plantain cultivars FHIA-21 (resistant) and Curraré (susceptible) were used following the artificial inoculation of 10 *M. fijiensis* monosporic culture from different regions of Costa Rica to identify the *M. fijiensis* strain with the highest level of virulence. The strain selected as virulent was used to verify the standard method as well as the mesophyll cells method under *in vitro* conditions for the same cultivars. The latter method required the extraction of the crude *M. fijiensis* (FcMf) filtrate and the establishment of a dilution gradient for FcMf incubated at 25±1°C during 24, 48, and 72 hours.

The results obtained from the standard method in the selection phase of the strain with the highest level of virulence showed the degree of differential resistance between the cultivars and the virulence level for the analyzed strains. The Peralta strain was selected in order to follow up with pathogenic tests. The same behavior obtained in the selection phase was observed when the tests were done with the Peralta strain using the standard method. This refers to the degree of differential resistance capacity, principally the stomata penetrated by necrotic guard cells, and the blocking of the evolution of symptoms. It reaches stage 2 development of the disease at 15 days without presenting advanced stages until the 41st day after inoculating the resistant cultivar FHIA-21. In the susceptible cultivar, Curraré, the presence of necrotic guard cells was not observed in the early stages of the infection. In addition, the first lesions, corresponding to stage 2 of the disease, appeared 30 days after

inoculation. The lesion size increased until evaluation day 45 where advanced stages of the infection were present.

The progressive loss of the viability percentage, when the concentration and the incubation time with FcMf were increased, was observed in the tests of early selection of resistance *in vitro* when applying the different dilutions of FcMf on the cultivar mesophyll cells. In the resistant cultivar FHIA-21, the highest number of dead cells was found for all of the treatments and lecture hours. Meanwhile, the susceptible cultivar, Curraré, showed the highest quantity of cells with chloroplasts organized abnormally and alterations in the cell wall and after 24 hours of incubation with FcMf in all the treatments. In terms of consistency, reproduction, and confidence in the results, it was concluded that the standard method was the best for the mesophyll cells method. The latter is very fast, but it requires more studies.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Reacción de Subgrupos y Cultivares en plantaciones de musáceas en Njombe, Camerún (adaptado de Mourichon <i>et al.</i> 2000).....	15
Cuadro 2. Diferentes diluciones de de FcMf con células del mésofilo de los cultivares FHIA-21 y Curraré.....	27
Cuadro 3 Severidad de Sigatoka negra (Fouré 1985) con diferentes cepas de <i>M. fijiensis</i> inoculadas sobre el cultivar de plátano FHIA-21 del 12 al 28 después de la inoculación.....	35
Cuadro 4. Severidad de Sigatoka negra (Fouré 1985) con diferentes cepas de <i>M. fijiensis</i> inoculadas sobre el cultivar de plátano Curraré del 12 al 28 después de la inoculación.....	35
Cuadro 5. Número de conidios germinados, número de estomas penetrados y número de células de guarda necrosadas, a los días 5, 9 y 11 después de la inoculación en los cultivares de plátano FHIA-21 (R) y Curraré (S) inoculados con la cepa Peralta.....	36
Cuadro 6. Severidad de Sigatoka negra (Fouré 1985) y ABCPE sobre los cultivares de plátano FHIA-21 (R) y Curraré (S) inoculados con la cepa Peralta desde el día 15 hasta el 45 después de la inoculación.....	39
Cuadro 7. Cuadro comparativo en términos de costos, reproducibilidad y confiabilidad, entre los métodos estándar y células del mésofilo, para realizar pruebas de evaluación temprana de resistencia a <i>M. fijiensis</i>	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida de *M. fijiensis* (adaptado de El Hadrami 2000).....7
- Figura 2. Diferenciación genética de poblaciones de *M. fijiensis* en un ámbito global9
- Figura 3. Procedencia de las cepas de *M. fijiensis* en estudio.....23
- Figura 4. Comportamiento de las 10 cepas analizadas en los cultivares de plátano FHIA-21 (R) y Curraré (S), en relación con las variables: a) Número de conidios germinados; b) Número de estomas penetrados y c) Estomas penetrados con células de guarda necrosadas durante los días 5, 7, 9 y 11 después de la inoculación.....31
- Figura 5. Diferentes estadios de desarrollo de *M. fijiensis* a) extensión del micelio de *M. fijiensis* sobre la hoja del cultivar Curraré a los 5 días después de la inoculación; b) sitios de penetración de penetración vía estomática de los tubos germinativos en crecimiento de *M. fijiensis* en el cultivar FHIA-21 a los 7 días después de la inoculación y c) sitio de penetración y célula de guarda necrosada en el cultivar FHIA-21 a los 11 días después de la inoculación.....38
- Figura 6. Porcentaje de viabilidad total de las células del mesófilo (CM) para los cultivares FHIA-21 (R) y Curraré (S) en relación a células muertas. a) tratamiento y b) hora de lectura.....40
- Figura 7. Porcentaje de viabilidad de las células del mesófilo de los cultivares FHIA-21 (R) y Curraré (S) en relación a células con cloroplastos organizados anormalmente acompañados con alteraciones a nivel de pared celular. a) por tratamiento; b) por hora de lectura.....42
- Figura 8. Ilustra preparaciones de suspensión de células del mesófilo tratadas con la FcMf. a) Célula viva, con cloroplastos bien diferenciados y situados en la periferia en contacto con la membrana plasmática control, b) Célula muerta cultivar FHIA-21, a las 48 horas y c) célula

con cloroplastos dispersos alrededor del citoplasma en el cultivar Curraré a las 24 horas.....43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Estudios citológicos de la interacción entre <i>M. fijiensis</i> y tres cultivares de musa con diferentes niveles de resistencia.....	58
Anexo 2. Características de los cultivares FHIA-21 (R) y Curraré (S) a la Sigatoka negra	60
Anexo 3. Medios utilizados para la extracción de las células del mesófilo.....	61
Anexo 4: Número de estomas de los cultivares de plátano FHIA-21 (R) y Curraré (S).....	62
Anexo 5. Promedios de número de conidios germinados en los cultivares FHIA-21 y Curraré, a los 11 días de evaluación.....	63
Anexo 6. Regresión lineal entre el número de estomas penetrados (NEP) y número de conidios germinados (NCG) para los cultivares de plátano FHIA-21 y Curraré.....	64
Anexo 7. Evaluación de resistencia <i>in vitro</i>	65
Anexo 8. ANOVA para las variables número de conidios germinados (NCG), número de estomas penetrados (NEP) y células de guarda necrosadas (CGN).....	66

1. INTRODUCCIÓN

En el año 2002, según la base de datos estadísticos de la FAO, la producción de plátano registrada a nivel mundial alcanzó un área cultivada de 5,029.997 millones de hectáreas y una tasa de producción de 30,471.870 ton/anuales, con un total de importaciones de 14.4 millones de toneladas, las cuales representan la suma de 95,280,000 US\$. Las regiones más productoras en el mundo se encuentran en África (73%), América Latina y el Caribe (25%) y un bajo porcentaje en los países del Asia (3%).

El plátano, es producido principalmente en los países tropicales como cultivo de subsistencia por pequeños y medianos productores. Representa una importante fuente de ingresos para América Latina y el Caribe, donde su consumo se considera parte esencial dentro de la dieta diaria para muchas familias. América Latina y el Caribe, aporta una producción del 7.1% con un valor promedio de 2,000 millones de dólares, donde los principales productores son: Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panamá, Perú y Venezuela (FAO 2002).

Existen diversos problemas fitosanitarios como las enfermedades y plagas que afectan la producción del plátano en el mundo, sin embargo, la enfermedad conocida como Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es considerada la más destructiva, ya que afecta el follaje de las especies de Musáceas, disminuyendo a su vez los rendimientos y la calidad del fruto. Esta enfermedad, reduce la producción en un 50% o más en fincas de pequeños productores, al no realizar las prácticas de manejo adecuadas. El control químico y la selección de plantas resistentes han sido, hasta la fecha, las únicas estrategias para el control de esta enfermedad, la cual representa una gran limitante para los pequeños productores, quienes no pueden incurrir en los altos costos que requiere la aplicación de agroquímicos, además de los riesgos ocasionados al ambiente, la salud humana y animal.

La producción de nuevas variedades de plátano resistentes a la Sigatoka negra y a otras enfermedades, por medio del mejoramiento genético convencional, ha sido limitada debido a la alta esterilidad y niveles de ploidía de los diferentes cultivares.

El uso de técnicas no-convencionales como la transformación genética constituye una alternativa prometedora para el desarrollo de plantas resistentes a las enfermedades más importantes que afectan al cultivo de plátano. Las herramientas de biología molecular ofrecen la posibilidad de clonar y caracterizar genes relacionados con la respuesta de defensa de las plantas a patógenos y adicionalmente, introducirlos en variedades susceptibles con características comercialmente aceptadas (Rosales y Pocasangre 2002).

Los híbridos generados bajo estas metodologías (convencional y no convencional), necesitan ser sometidos a evaluación siguiendo pruebas de patogenicidad; con el fin de comprobar la resistencia o no a este patógeno. El establecimiento de un método rápido de detección de resistencia a nivel de invernadero o de laboratorio, facilitaría la selección de variedades resistentes, no solamente para plantas transformadas genéticamente vía no-convencional; sino también, aquellas provenientes de métodos primarios de la biotecnología como variantes somaclonales *in vitro*, presión de selección en suspensiones celulares y protoplastos.

El objetivo de este estudio, es el de adaptar, un sistema de evaluación rápida de resistencia a la enfermedad foliar conocida como Sigatoka negra, bajo condiciones controladas *in vitro* e invernadero para plantas de plátano producidas por los diferentes programas de mejoramiento genético convencional o no, en cultivos de *Musa*.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 GENERAL

Desarrollar metodologías para la identificación rápida de resistencia a la Sigatoka negra en el cultivares de plátano.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Seleccionar una cepa costarricense de *M. fijiensis* con alto nivel de virulencia a la Sigatoka negra en clones de plátano FHIA-21 (R) y Curaré (S), mediante el protocolo de infección estandar de pruebas de patogenicidad.
2. Estandarizar y/o desarrollar dos metodologías para la evaluación temprana de resistencia a la Sigatoka negra en variedades de plátano, resistentes y susceptibles.
3. Comparar las dos metodologías desarrolladas en función de eficiencia, confiabilidad y reproducibilidad.

1.1.3. HIPOTESIS

1. La cepa virulenta seleccionada es capaz de discriminar entre una variedad resistente de una susceptible.
2. Los métodos alternativos de evaluación temprana de resistencia a la Sigatoka negra, mediante el cultivo *in vitro*, son más eficientes y rápidos que el método estándar.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Aspectos generales del cultivo del plátano

El plátano y el banano, son frutas tropicales cuyo lugar de origen se encuentra en el sudeste asiático, probablemente Malasia, China Meridional e Indonesia. Desde allí, fue llevado a Madagascar en el siglo XV y luego difundido a la costa oriental y central de Africa. En el siglo XV los portugueses lo encontraron en la costa occidental africana, en la región de Guinea, llamándolo *guineo*. Hacia 1516 el padre Tomás de Berlanga lo introdujo en la isla La Española, en el Caribe, probablemente llevándolo desde las islas Canarias, donde se cultiva desde 1450 (Simmonds 1962, Rodríguez y Rodríguez 2003).

Existen diversas enfermedades y plagas que afectan significativamente el cultivo del plátano como las causadas por los virus Banana bunchy top virus (BBTV), Banana streak virus (BSV) y Cucumber mosaic virus (CMV) (Lockhart & Jones 2002, Caruana 1999, Reichal *et al.* 1997). Además, problemas sanitarios causados por bacterias como *Ralstonia solanacearum* la cual produce la enfermedad conocida como Moko, los ataques ocasionados por nematodos (Pocasangre 2002) y plagas inséctiles como el picudo (Gold *et al.* 2003, Carballo y López 1994). En el caso de las enfermedades causadas por hongos, podemos citar: *Fusarium oxysporum*, causante del mal de Panamá (Ploetz 1993), *Mycosphaerella musicola* agente causal de la Sigatoka amarilla y *Mycosphaerella fijiensis* responsable de la Sigatoka negra, enfermedad que ha renovado el interés en el mejoramiento convencional y no-convencional del cultivo de las Musáceas (Rosales y Pocasangre 2002).

Recientemente, un nuevo tipo de enfermedad foliar con síntomas muy cercanos a los causados por Sigatoka negra, ha sido descubierta en el sur de la India, Sri Lanka, Tailandia, Malasia, Vietnam, islas Mauricio y Nigeria. Esta enfermedad es causada por el hongo *Mycosphaerella eumusae* (forma anamorfica: *Septoria eumusae*) con ciclos infecciosos muy parecidos a los observados en la Sigatoka negra. A pesar de la similitud, Sigatoka negra presenta una alta competitividad por nichos y colonización, siendo la más agresiva, llegando incluso a desplazar a las otras enfermedades (Crous and Mourichon 2002; Carlier *et al.* 2000).

En las especies de *Mycosphaerella* que afectan los cultivares de Musa, la morfología anamórfica parece ser más informativa que la morfología teleomorfa para separar los principales patógenos del género *Mycosphaerella* que afectan este cultivo (*M. musicola*, *M.*

fijiensis y *M. emusae*), ya que se basa principalmente en la estructura conidiomatal y la conidiogénesis (Crous y Mourichon 2002).

2.2 Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis morelet*)

2.2.1 Distribución geográfica

La Sigatoka negra, fue identificada por primera vez en 1963, en las islas Fiji en la costa sudeste del Valle de Viti Levi (Rhodes 1964).

En el continente Africano, el primer reporte de la enfermedad ocurrió en Zambia en 1973 (Reamarkers, 1975), posteriormente, se presentó en Gabon en el año de 1978 (Frossard 1980). La enfermedad continuó su expansión en la parte central y este del Africa, reportándose en Nigeria (1986), Ghana (1986), Uganda y Malawi en 1990 (Carlier *et al* 2000) y recientemente en Madagascar (2000) (Mourichon y Zapater, datos no publicados).

La primera aparición de la Sigatoka negra en América Latina ocurrió en Honduras en el año de 1972 (Mourichon y Fullerton 1990). La enfermedad se diseminó progresivamente a otros los otros países de la región. Entre 1973 y 1980 severas epidemias ocurrieron en el continente, diseminándose hacia Belice, Guatemala, el Salvador, Nicaragua hasta Costa Rica. Posteriormente, en 1981, la enfermedad fue reportada en México, Panamá y Colombia. En 1986, se presenta en Ecuador (Martínez *et al.* 1999; Fullerton 1990) y durante la década siguiente, se registró en Cuba (1990) y en Venezuela (1991).

La enfermedad continuó su expansión y su presencia fue reportada en Perú en 1994 y Bolivia en 1996 (Tejerina *et al.* 1998). En los años siguientes, se presentaron reportes en Jamaica y en Republica Dominicana (1995-96 respectivamente). En los Estados Unidos, la primera detección de Sigatoka negra ocurrió en 1997, en el estado de la Florida, en cultivares de la colección del centro de educación e investigación tropical de la Universidad de la Florida, estación experimental de Homestead (Ploetz y Mourichon 1999). El último registro en suramérica se refiere al Brazil en 1998. En 1999, se reportó la presencia de la enfermedad en plantaciones de Haití (Mourichon y Fullerton 1990).

2.2.2. Biología y ciclo de vida del patógeno

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

Mycosphaerella fijiensis, ha sido clasificado taxonómicamente dentro del reino Fungi, phylum Ascomycota, clase Ascomycetes, orden Dothideales, familia Mycosphaerellaceae y género *Mycosphaerella*. Este hongo es heterotálico, se caracteriza por presentar dos formas reproductivas claramente diferenciadas en su fase sexual y asexual. Esto último le proporciona una amplia capacidad de infección y mayor plasticidad genética, gracias a la recombinación. Los estados anamórficos y teleomórficos están presentes en las hojas infectadas y las ascosporas producidas en el estadio sexual son determinantes en el desarrollo de la epidemia (Mourichon y Zapater 1990).

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

Los peritecios varían en cuanto a sus características, pero en su mayoría son globulares con un diámetro entre 47 y 85 μm , se observan incrustados en el tejido de la hoja y se pueden visualizar en ambas superficies, aunque son más abundantes en el haz que en el envés. Las paredes del peritecio son de color marrón oscuro y están formadas por tres o cuatro capas de células con forma poligonal. Dentro del peritecio se forman numerosas ascas que son

bitunicadas y oclavadas. Las ascosporas tienen dimensiones que alcanzan las 12.5 – 16.5 μm x 2.5 – 3.8 μm y son biceldadas con la célula más predominante unida al asca (Mulder and Holliday 1974).

El ciclo de vida de *M. fijiensis*, se inicia con la germinación de las esporas, seguida de la penetración. Ambos procesos requieren de la presencia de una película de agua sobre la superficie de la hoja. La germinación de las esporas se da en aproximadamente 2 horas, aparecen los tubos germinativos los cuales se alargan y ramifican en búsqueda de los estomas, donde penetran y se desarrollan por los espacios intercelulares. Dicha penetración ocurre entre la 48 y 72 horas si las condiciones de humedad y temperatura son favorables, la temperatura óptima es próxima a los 26°C. El desarrollo de las primeras lesiones da inicio a la fase asexual, en los estomas, aparecen algunos conidióforos, principalmente por el envés de la hoja (Stover 1987). A los 28 días de la infección aparecen los primeros conidios y a los 49 días finaliza el ciclo cuando se da la liberación de las primeras ascosporas (Merchán 1998).

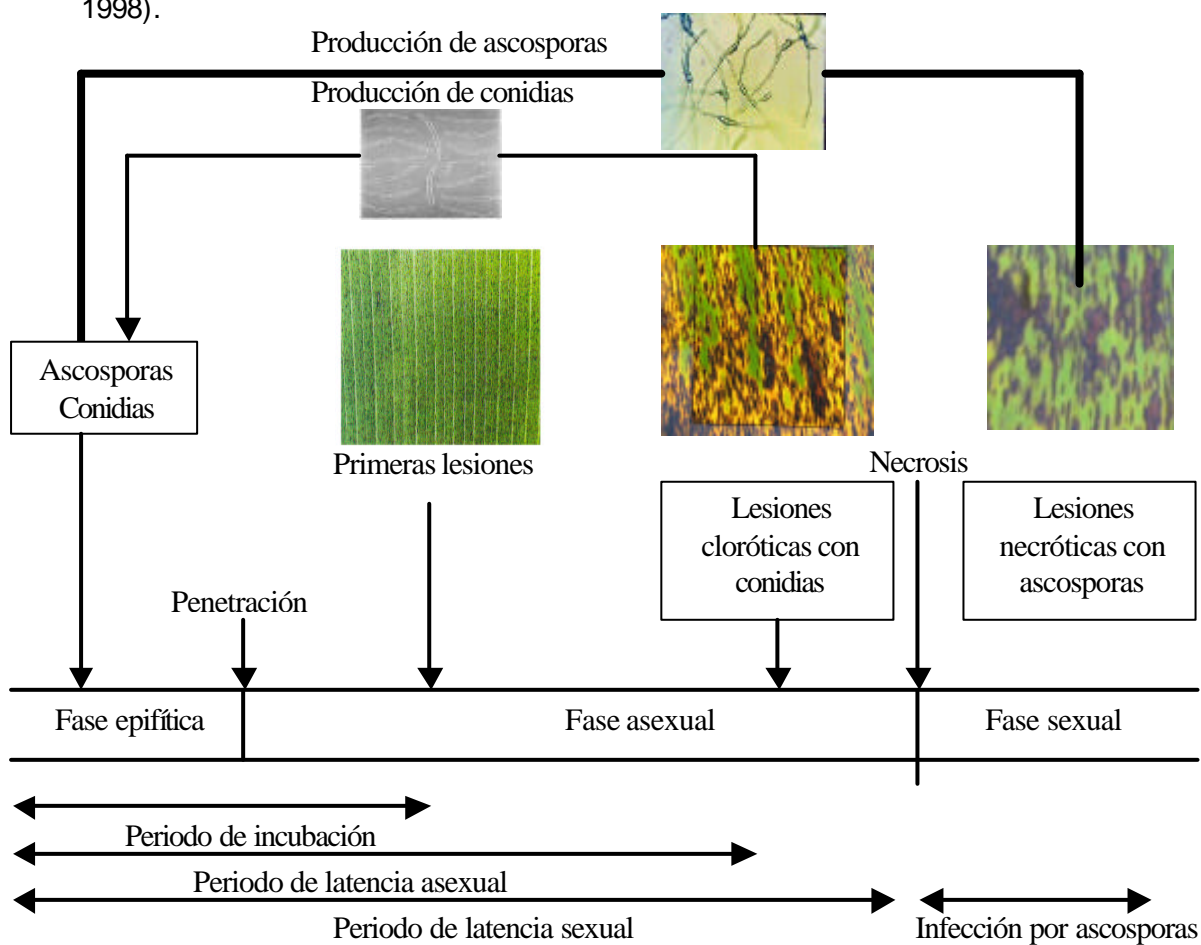


Figura 1. Ciclo de vida de *M. fijiensis* (adaptado de El Hadrami 2000).

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

El período de latencia, se define como el tiempo en que tarda el hongo en producir lesiones con presencia de pseudotecios y ascosporas viables. Al igual que en el período de incubación, el período de latencia se ve influenciado por las condiciones climáticas, susceptibilidad del hospedero y la intensidad de la infección. Este período, se encuentra en un rango de 25 días bajo condiciones de alta humedad y 70 días en la temporada seca. Durante la época húmeda, se presenta una alta descarga de ascosporas y un rápido desarrollo de la infección (Marin *et al.* 2003).

2.2.3. Síntomas de la enfermedad

Según Fouré (1985), el desarrollo de la enfermedad conocida como Sigatoka negra presenta los siguientes seis estadíos:

Estadío	Descripción
1	Se presenta una pequeña decoloración que solo se observa en el envés de la hoja por transparencia. Incluye una pequeña "pizca" de color café rojizo dentro del área decolorada.
2	La pequeña mancha o estría inicial de color café rojizo se alarga y continúa visible solo en el envés de las hojas.
3	La estría aumenta de grosor y longitud; se mantiene de color café rojizo y se hace visible tanto en el haz como en el envés de las hojas.
4	La estría continúa aumentando su grosor y longitud, ocurre un cambio de color a café oscuro y negro. Este síntoma se considera como mancha y se hace claramente visible en el haz de la hoja.
5	La mancha negra esta rodeada por un halo amarillo y se presenta una ligera depresión en la hoja, producto de la coalescencia de las manchas.
6	La mancha se seca el centro de la lesión y adquiere un color gris claro y la rodea un anillo bien definido de color negro, rodeado a su vez por un halo de color amarillo brillante. Estas manchas, se podrán observar aún después de que la hoja se ha secado ya que el anillo persiste.

2.2.4. Estructura genética de poblaciones de *M. fijiensis*

La estructura de poblaciones, se refiere a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones. Dicha información puede ser utilizada para determinar el impacto relativo de las diferentes fuerzas evolutivas que influyen la estructura de las poblaciones del patógeno y así predecir su potencial de evolución dentro de los ecosistemas agrícolas (McDonald 1997).

Estudios para determinar la diversidad genética de *M. fijiensis* en el ámbito global, fueron realizados por Carlier *et al.* (1996); estos trabajos demostraron que el centro de origen del patógeno es coincidente con el de su hospedante. Los aislamientos provenientes de las zonas del Sudeste del Pacífico mostraron mayores índices de diversidad que aquellas muestras de otros continentes (África y América Latina). Por otro lado, se registró una marcada diferenciación genética entre los aislamientos estudiados, el estimador F_{st} varió entre 0.14 a 0.58 para esas poblaciones. Las poblaciones de América Latina y África fueron estadísticamente diferentes, lo que sugiere introducciones independientes en estos continentes (Figura 2).

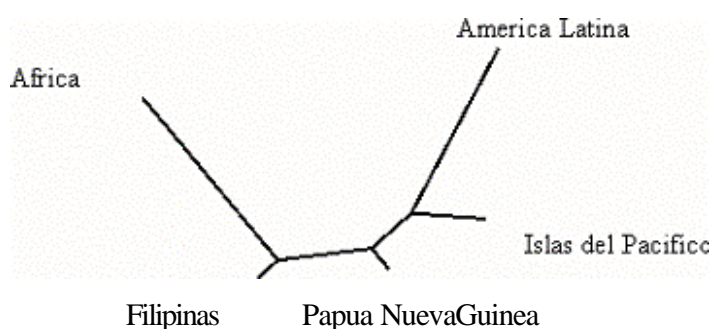


Figura 2 Diferenciación genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* en un ámbito global (Carlier *et al.* 1996).

Se han realizado trabajos acerca del flujo de genes y diseminación de *M. fijiensis* en el ámbito continental y local, se efectuaron colectando aislamientos del patógeno en plantaciones de banano y plátano procedentes de 13 países de África y América Latina. Se usaron 705 aislamientos obtenidos a partir de una sola ascóspora y fueron analizados mediante la utilización de CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) y marcadores microsatélites (Rivas *et al.* 2002).

Se demostró, un alto nivel de diversidad genética y genotípica de las poblaciones del patógeno, a nivel de continente y de países. Se destacó que, los efectos de fundación que han acompañado las otras introducciones del patógeno han reducido su diversidad genética. Por lo tanto, la introducción del patógeno en una nueva área, puede haber involucrado el movimiento de un pequeño número de individuos que representan una fuente limitada genotípica de la población de origen. En América Latina, se encontró un alto nivel de diferenciación genética entre las poblaciones, las poblaciones más diversas, corresponden a Honduras y Costa Rica, mientras que se presenta una marcada diferenciación genética entre las islas del Caribe. Mientras que las poblaciones más distantes genéticamente, fueron encontradas en República Dominicana-Panamá y Cuba-Panamá (Rivas Platero 2003).

En África, se observó una estructura similar a la de América Latina con efectos de fundación y una diferenciación global de 52%. Estos resultados sugieren, que la existencia de una diseminación aleatoria de la enfermedad y un flujo limitado de genes en el continente. Esto, podría deberse, a la limitada dispersión de las ascosporas y que las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* presentes en el continente son diferentes unidades epidemiológicas (Rivas *et al.* 2002, Rivas Platero 2003).

El conocimiento de la magnitud y distribución de la variación genética de *M. fijiensis*, es importante para el mejoramiento y manejo de la resistencia a la Sigatoka negra. El uso de marcadores moleculares, ofrece la oportunidad de analizar las estructuras de las poblaciones del patógeno a diferentes escalas geográficas. Además, permite identificar el potencial de resistencia de los cultivares en áreas donde exista diversidad patogénica. Asimismo, identificar zonas de mayor diversidad genética del patógeno; donde pudiesen hacerse las pruebas de resistencia de los materiales resistentes a un patógeno (Rivas Platero 2003).

2.2.5 Métodos de control

El control químico, ha sido el método más utilizado para el manejo de la Sigatoka negra. Sin embargo, debido al desarrollo de altos niveles de resistencia del patógeno a la mayoría de los fungicidas utilizados convencionalmente, los altos costos que esto implica, e innumerables problemas de contaminación y efectos nocivos para la salud humana y animal, ha surgido la necesidad de encontrar un mecanismo de control que no ocasione pérdidas económicas ni daños ambientales.

Debido a esta problemática, Se han considerado varios enfoques de control integrado, que involucran prácticas culturales, predicción y uso racional de aplicaciones de compuestos químicos y siembra de cultivares resistentes. Así como, el control biológico mediante el empleo de substratos, antagonistas, enmiendas orgánicas y el uso de moléculas inductoras de resistencia. (Gúzmán 2002).

Prácticas culturales

La reducción del inóculo del patógeno, a través de labores de cultivo, es una de las principales estrategias para el control de la enfermedad. La remoción de las hojas viejas en el suelo, la poda sanitaria y la aplicación de urea para acelerar la descomposición del tejido vegetal en el suelo, se han utilizado como estrategias para reducir la densidad del inóculo. Además, de un sistema eficiente de drenaje y una fertilización adecuada de las plantas para lograr un manejo adecuado de la enfermedad (Balalcázar 2000).

En la actualidad, se está evaluando una nueva tecnología para el cultivo del plátano, que fue desarrollada en la zona cafetalera de Colombia, con muy buenos resultados. Esta tecnología consiste en establecer el cultivo de plátano a altas densidades de siembra lo cual, no solo permite triplicar la producción, sino que además, favorece la formación de un micro y meso clima, que genera condiciones desfavorables para el patógeno (Rosales *et. al* 2002, Balalcázar 2000).

Mejoramiento genético

La resistencia genética, es una de las mejores alternativas para el control de la Sigatoka negra. Los híbridos desarrollados por el programa de mejoramiento genético convencional de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), han sido distribuidos en más de 50 países alrededor del mundo y han sido evaluados mundialmente desde 1991, con el inicio del Programa Internacional de evaluación de Musáceas patrocinado por INIBAP (Rosales y Pocasangre 2002).

De estos híbridos mencionados sobresalen en banano de postre: FHIA-01, FHIA-02, FHIA-18, en bananos de cocción : FHIA-03 y el recientemente liberado FHIA-25, y en plátano los clones FHIA-20 y FHIA-21 (Rosales y Pocasangre 2002).

Todos los híbridos liberados hasta la fecha, poseen adecuadas características comerciales y resistencia o tolerancia a la Sigatoka negra y a enfermedades como el mal de Panamá. Además, poseen en general, un rango adecuado de adaptación agroclimática y si se aplican las prácticas agronómicas adecuadas pueden ser aprovechados a su máximo potencial.

Actualmente, estos híbridos han tenido gran éxito en países como Cuba donde se cultivan cerca de 10,000 Has, principalmente de FHIA-18, FHIA-23 y recientemente FHIA-21 (Rosales y Pocasangre 2002). En los últimos 10 años, se iniciaron otros programas internacionales de mejoramiento genético convencional en Brasil, Camerún y Guadalupe, orientados hacia el desarrollo de variedades resistentes a la Sigatoka negra y otras enfermedades del cultivo (Rosales y Pocasangre 2002).

En el mejoramiento genético no convencional, se encuentra la utilización de las herramientas de la biotecnología en sus estadios primarios de cultivo *in vitro* de las plantas, con el fin de aumentar la variabilidad genética existente, utilizando agentes de presión de selección, ya sea a través de suspensiones celulares, variación somaclonal, mutagenesis inducida e hibridación somática (Ortíz *et al.* 2002).

Además, la biotecnología, brinda la posibilidad de obtener material libre de patógenos y obtener nuevas líneas para efectuar selecciones y evaluaciones. Estas metodologías, han facilitado la manipulación y mejoramiento del material genético de *Musa* aplicando técnicas de genética molecular, para su perfeccionamiento mediante el análisis del genoma y el desarrollo de sistemas de mejoramiento asistido con marcadores del tipo RFLP y muchos otros basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como los AFLPS, microsatélites, entre otros (Carreel 1995).

Control químico

El control químico para el manejo de la Sigatoka negra, se ha realizado alternando fungicidas protectantes (Macozeb y Clorotalonil) con sistémicos, de la familia de los benzimidazoles, azoxitrobina y triazoles, aplicados con aceites o emulsiones en agua con adherentes. Se ha demostrado, que el uso excesivo de productos químicos, puede traer serios problemas de contaminación y fototoxicidad. Además, problemas de carácter económico y resistencia de los patógenos. El uso continuo de algunos fungicidas, puede

generar poblaciones que no sean lo suficientemente sensibles para ser controladas de manera adecuada. (Guzmán y Romero 1997, Guzmán 2002; Marin *et al* 2003).

El problema en este momento, radica principalmente en que el sistema *per se*, ha perdido vigencia, dada la enorme resistencia del patógeno a estos fungicidas. No obstante, se están probando fungicidas, que presentan algún grado de control a la enfermedad. El Pyraclostrobin, presenta un nivel de control similar al Azoxistrobina y Trifloxistrobin y el Pyrimetanil, ha mostrado buen control de la enfermedad, aunque apenas comparable con el fungicida protectante. Sin embargo, podría ser una alternativa dentro de un programa normal de rotación o en mezcla con otros fungicidas, sobretodo sistémicos, ya que no presenta resistencia cruzada con los grupos conocidos (Guzmán 2002).

Control biológico

Otros métodos de control que se están investigando, son compuestos de origen natural, que han demostrado actividad antifúngica *in vitro*, y por lo tanto, pueden reducir el desarrollo del patógeno. Estos productos “promisorios” están siendo evaluados en condiciones de inoculación natural en campo (Riveros *et al.* 2002).

El desarrollo de formulaciones comerciales, mediante la utilización de microorganismos antagonistas como: *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.*, *Serratia entomophila* y *Serratia marcescens*, tampoco han demostrado un eficiente mecanismo de control de la enfermedad, a pesar de que su efecto antagónico a nivel de campo, podría aumentarse en combinación con fertilizantes foliares y/o melazas (González *et al.* 1996).

En esta misma línea de investigación, se han realizado estudios con aislados de *M. fijiensis* y utilizando filtrados de microorganismos (cepas aún no identificadas) con capacidad glucanólítica y quitinolítica (GS2-GS3-GC1-GBC2,SE/PO2). Se evaluó, el efecto de los filtrados sobre el desarrollo del patógeno bajo condiciones *in vitro* para determinar la existencia o no de inhibición del tubo germinativo de las ascosporas y disminución en el desarrollo de las colonias de *M. fijiensis*, mostrando importantes niveles de inhibición (Riveros *et al.* 2002).

En investigaciones realizadas por Patiño (2001), se evaluaron moléculas sintéticas inductoras de resistencia, las cuales se han considerado como uno de los métodos

alternativos más importantes para el control de la enfermedad. El compuesto sintético que más se ha destacado en este campo, ha sido el Acibenzolar-s-metil (Actigard[®] y/o Boost[®]). La utilización de este producto, en combinación con otros fungicidas, ha demostrado un mejor control de la enfermedad, en comparación con la aplicación de estos fungicidas solos. Se ha observado una rápida reducción en los niveles de severidad de la enfermedad, en pruebas realizadas con cultivares resistentes y susceptibles. Se ha logrado que cultivares susceptibles alcancen niveles de defensa similares al de un cultivar resistentes, lo cual indica, que es posible la activación de genes relacionados con la defensa hacia la Sigatoka negra en cultivares clasificados como susceptibles.

2.3. Relación parasitaria *M. fijiensis* – *Musa*

Los primeros estudios, sobre la relación parasitaria *M. fijiensis* – *Musa*, fueron realizados con plantas de banano, propagadas mediante cultivo de tejidos. Los resultados obtenidos de estas investigaciones, muestran que los síntomas de las interacciones compatibles e incompatibles bajo condiciones ambientales controladas (en invernadero). Los resultados fueron similares a los registrados por Fouré y Moreau (1992) en condiciones de campo, sobre cultivares de banano y plátano con constituciones genéticas diferentes, en plantaciones de Camerún (cuadro 1).

Estudios citológicos han revelado que, independientemente del cultivar, las hifas de *M. fijiensis* en las etapas tempranas de infección se comporta como un parásito biotrófico que coloniza los espacios intercelulares. Los procesos de germinación y penetración del patógeno bajo condiciones controladas, tienen lugar entre los 4-6 días, posteriores a la inoculación, este proceso, involucra la germinación de las esporas y el subsiguiente crecimiento micelial. El desarrollo de las hifas, ocurre dentro de la cavidad estomática, penetrando en los espacios intercelulares entre las células del parénquima (Beveraggi 1992).

Cuadro 1. Reacción de Subgrupos y Cultivares en plantaciones de musáceas en Njombe, Camerún (adaptado de Mourichon *et al.* 2000).

Grupo Genómico	Subgrupo/clon [§]	Cultivar Evaluado	Reacción*
AAA	Subgrupo Gros Michel	'Gros Michel', 'Cocos', 'Highagate'	S
	Subgrupo Cavendish	'Petite Naine', 'Gran Enano', 'Poyo'	S
	Subgrupo Lujugira-mutika	'Inokatoke', 'Intuntu', 'Igitsri', 'Mbwazirume', 'Nakitengwa'	S
	'Red y Green Red'	'Figue Rose Naine', 'Figue Rose Verte', 'Figue Rose Naine'	S
	'Ibota Bota'	II 'Yangambi Km5', 'Kluai Khom Bao', 'Kluai Khai Thong Ruang'	HR
	'Oratava'	'Oratava', 'Pisang Kayu'	S
	Otros	'kluai Hom', 'Pisang Sri', 'Kluai Hom Thong Mokho'	PR
AB	'Ney Poovan'	'Safet Velchi', 'Lal Kelat'	PR
		'Figue Pomme, Ekona'	S
AAB	Subgrupo de plátano	'Amou', 'French Sombre', 'French Clair', 'Kelong Mekintu', 'Orishele', 'Msinyore',	S
	Subgrupo Pome	'Prata Ana', 'Foconah', 'Nadan', 'Guindy',	S
	Subgrupo Maia Maoli-Populu	'Iho U Maoli', 'Popoulu', 'Poingo'	S
	Subgrupo Iholena	'Mattui', 'Maritu'	PR
	Subgrupo 'Silk'	'Figue Pomme', 'Muthia', 'Supari'	S y PR
	'Mysore'	'Pisang Ceylan', 'Gorolo', 'Zabi'	PR
	'Pisang Raja'	'Pisang Rajah Bulu'	S
	'Pisang Kelat'	'Pisang Pulut', 'Pisang Kelat'	S y PR
	'Laknau'	'Laknao'	S
'Nendrapadathi'	'Pisang Rajah'- from Rajapuri, India	S	
ABB	Subgrupo Bluggoe	'Cacambou', 'Cachaco', 'Poteau', 'Monthan'	PR
	'Pisang Awak'	'Fougamou', 'Gia Hong', 'Foulah 4', 'Brazza 2'	PR* y PR
	'Pelipita'	'Pelipita'	PR
	'Peyan'	'Simili Radjah'	PR
	'Kluai Teparoy'	'Kluai Tiparot'	PR*
	'Ney Mannan'	'Pisang Abu Perak'	PR
	'Saba'	'Saba'	PR
	'Inibaniko'	'Benedetta'	PR

§ Nombre del mejor clon conocido

* Clasificación utilizando cultivares Cavendish como clones de referencia S= altamente susceptibles; PR= parcialmente resistentes; PR*= fuerte resistencia parcial (interacción compatible de Fouré) y HR= altamente resistente (interacción incompatible de Fouré).

II Este cultivar ha sucumbido recientemente a la Sigatoka negra in Camerún (Moulion-Pefoura 1999).

En la década de los 80, se dio inicio a la realización de trabajos orientados al desarrollo y estandarización de métodos para la evaluación rápida de resistencia a la Sigatoka negra. Se usó material vegetal proveniente de cultivares de *Musa* en estados organogénicos que varían desde callos, células del mesófilo, fragmento de hoja y hojas completas en plantas provenientes de cultivos *in vitro*.

2.3.1. Interacción incompatible : cultivar resistente

La reacción de hipersensibilidad a *M. fijiensis*, representa el primer paso hacia la caracterización de esta relación parasitaria. Esta reacción de resistencia vertical, a menudo opera dentro de una relación gen por gen y podría convertir la resistencia en inestable y poco duradera en el tiempo (Riveros 2002).

La información sobre la reacción incompatible, proviene básicamente de estudios realizados con el cultivar Yangambi Km5 (YKm5) que pertenece al subgrupo 'Ibota Bota' con genotipo AAA. La interacción se caracteriza por una rápida aparición de necrosis o muerte celular luego de la penetración del patógeno (Beveraggi *et al.*1995; Riveros 1995).

Para comparar la reacción del cv. YKm5 se emplearon los clones: Fougamou parcialmente resistente y Gran Enano susceptible, como cultivares susceptibles. A los 12 días después de la inoculación, se observó la presencia de las hifas del hongo en los estomas de los tres cultivares. Bajo microscopio electrónico se mostró la presencia de glóbulos osmiófilicos, estos aparecen como un material denso cubriendo el micelio del hongo y las células adyacentes del hospedero. Además, se observó un alto número de células con vacuolas ricas en glóbulos osmiófilicos, lo cual sugiere el inicio del colapso celular del hospedero al contacto con el micelio del hongo. Mientras que, en el caso del cultivar resistente (YKm5), para esta fase, se observó que el micelio del patógeno se encuentra completamente bloqueado (Beveraggi *et al.*1995; Riveros 1995).

Sallé *et al.* (1989), con base en microscopía electrónica, determinaron que en el cultivar YKm5 las células necróticas inician y frenan el desarrollo de síntomas en etapas muy tempranas de la infección. No se observaron glóbulos osmiófilicos a depósitos de polifenol. Probablemente, la muerte del hongo ocurre antes de los 20 días después de la inoculación. y No se visualizó desarrollo de hifas del patógeno en el interior del tejido de la hipodermis, posiblemente, producto de la reacción hipersensible en estados muy tempranos del desarrollo.

Por su parte Riveros (1995), siguiendo la misma metodología antes descrita, excepto que solo se evaluaron los cultivares YKm5 (resistente) y Gran Enano (susceptible). En este estudio, a los 11 días después de la inoculación, no se presentaron diferencias significativas

respecto al número de estomas penetrados entre los dos cultivares en estudio, debido a que el hongo continuó su proceso de penetración en la cavidad de los estomas: En el caso de YKm5, se observaron estomas penetrados con células de guarda y células anexas necrosadas.

Posteriormente, trabajos realizados siguiendo esta metodología, pero utilizando siete cultivares de *Musa*, entre ellos el clon FHIA-21 de plátano, fue comparada la resistencia con cultivares de banano. Los resultados mostraron que en el cv. FHIA-21, comparado con los otros clones en la investigación, mantiene los niveles de resistencia, por lo que fue clasificado como parcialmente resistente (Alvarado *et al.* 2002).

Otro método de evaluación de resistencia, mediante la inyección de hojas de banano de los cultivares YKm5 (R) y Gran Enano (S) con inductores hipotéticos, obtenidos mediante el fluido de esporas de *M. fijiensis* en germinación. Se evaluó la inducción de necrosis y aposiciones fluorescentes, alrededor de los sitios de penetración de *M. fijiensis*, como respuesta hipersensible. Se determinó que la respuesta necrótica y de aposición fluorescente fue más rápida e intensa en el cultivar resistente que en el susceptible (Riveros y Lepoivre 1998).

2.3.2. Interacción compatible: cultivar parcialmente resistente y susceptible

2.3.2.1. Cultivares parcialmente resistentes

La información más ampliamente descrita sobre la relación de resistencia parcial, proviene de estudios del cultivar de referencia Fougamou que pertenece al subgrupo 'Pisang Awak', genotipo ABB. Este clon presenta un lento desarrollo tanto en las lesiones como en la aparición de necrosis alrededor de los sitios de penetración, células que presentan plasmólisis y contienen glóbulos osmiófilicos intravacuolares (Beveraggi *et al.* 1995).

Sallé *et al.* (1989) y Beveraggi *et al.* (1995), al estudiar la interacción hospedero patógeno (*M. fijiensis*) en el cultivar Fougamou, observaron que en este cultivar parcialmente resistente, a los 28 días después de la inoculación, alcanzó el estadio dos de la enfermedad con un incremento en el número de glóbulos osmiófilicos vacuolares (Fig.2 anexo 1). Estos

resultados sugieren que el alto contenido de polifenol en los tejidos foliares de este cultivar, podría estar relacionado con el nivel de resistencia del hospedero.

La caracterización de la resistencia parcial, corresponde a diferentes estados del ciclo infeccioso, como el desarrollo de pequeñas lesiones, periodos largos de incubación y la baja producción de esporas (Abadie *et al.* 2002). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Alvarado *et al.* (2002) con los clones FHIA parcialmente resistente.

2.3.2.2. Cultivares susceptibles

La mayor parte de la información sobre esta reacción, proviene del estudio del cultivar susceptible Gran Enano que pertenece al subgrupo Cavendish con genotipo AAA. En este cultivar, durante las primeras etapas de infección, ocurre una extensiva colonización del micelio del hongo en el tejido del hospedero, sin evidenciar células de guarda necrosadas en etapas tempranas de infección (Sallé *et al.* 1989, Beveraggi *et al.* 1995 y Riveros 1995).

Campanioni *et al.* (2003), realizó aplicaciones del filtrado crudo y concentrado del hongo *Fusarium oxysporum*, mediante el método de perforado sobre el limbo de diferentes posiciones y tipos de hoja de los cultivares Gros Michel (S) y FHIA-01 (R), para medir la resistencia y el desarrollo de lesiones necróticas. Las áreas necróticas mayores se presentaron en el cultivar susceptible, con un desarrollo acelerado de las lesiones. En esta misma dirección, pero con la utilización de clones de *Musa*, los trabajos de Busogoro *et al.* (1999), sobre el estudio de las toxinas (juglone) de *M.fijiensis*, a nivel de planta entera inyectada, determinaron que en el cultivar susceptible Gran Enano, se presentó una mayor sensibilidad al contacto con las fracciones purificadas.

2.4. Técnicas de cultivo *in vitro* para la selección de resistencia a patógenos

Entre los materiales biológicos mas ampliamente utilizados como fuentes celulares en los sistemas de selección *in vitro*, se encuentran, el cultivo de callos. Sin embargo su utilización trae algunos inconvenientes como: (i) esta constituido por células indiferenciadas que crecen lentamente; (ii) las células no son uniformemente expuestas al agente selectivo incorporado en el medio de cultivo y (iii) las células crecen en grandes agregados, lo que dificulta el

desarrollo de las células resistentes a un determinado agente (Daub 1986, 1982; Gómez 1996).

La utilización las células en suspensión, como entidades individualizadas, presenta ventajas, ya que permite procesar grandes cantidades a partir de muy poco material. Son ideales para probar diferentes selectores en forma relativamente homogénea. Presenta división y crecimiento celular rápido (aprox. 5 días entre subcultivos) y pueden ser manipuladas de forma similar a los microorganismos (Daub 1986, 1982).

Las células del mesófilo y/o cultivo de protoplastos, son el material biológico ideal para aislar una línea pura de células. Individualizar e incrementar la eficiencia en la selección, si la población celular recibe de manera uniforme la misma presión del selector, es imposible lograr en cultivo de callos, ápices o yemas en medios de cultivo sólidos. Podría catalogarse como un método costoso, por la incorporación de enzimas para degradar pared celular, pero al analizar muestras en cantidad, los costos se bajan sensiblemente (Daub 1986, 1982).

2.4.1. Investigaciones realizadas sobre la relación parasitaria *Musa*– *M. fijiensis*

Carlson (1973) fue el primero en sugerir el uso de células y en particular los protoplastos en cultivo para estudiar la resistencia a toxinas de patógenos y plantas, con efecto significativo de respuesta a la infección.

Un buen selector para las pruebas *in vitro*, debe cumplir los siguientes requisitos: (a) la acción del metabolito (filtrado crudo, toxina semi o totalmente purificada) debe ser irreversible, esto es letal, no actuar como un inhibidor del crecimiento; (b) el producto usado no debe ser degradado en el medio de cultivo por otros factores y las células susceptibles deben morir antes de su degradación; (c) el único estrés en las células debe ser causado por el agente selectivo y (d) la respuesta debe manifestarse a nivel celular y existir una correlación positiva con la respuesta en la planta desarrollada (Gómez 1998).

Hernández (1995) estudió la respuesta de resistencia a nivel *in vitro* de callos de los cultivares Calcutta 4 (R) y Gran Enano (S), siguiendo la aplicación de fracción cruda de *M. fijiensis* a diferentes concentraciones. En el cultivar susceptible, se observó una reacción acelerada, la cual se caracterizó por una coloración azul oscuro en el área del callo más

próxima al contacto con el extracto. La reacción, aumentó, tanto en el transcurso del tiempo como al aumentar la concentración del extracto. En el cultivar resistente, se presentó una mayor resistencia al contacto con el extracto crudo de *M. fijiensis*. Sin embargo, la reacción de oxidación, se vio favorecida por la aplicación de la más alta concentración del extracto (Anexo 7).

Okole and Schulz (1997), para seleccionar material resistente a la Sigatoka negra, utilizaron micro secciones transversales provenientes de callos de los cultivares Williams (R) y Petit naine (S), los cuales fueron sometidos a diferentes concentraciones de la toxina purificada 2,4,8-tetrahydroxytetralone producida por el patógeno. Observaron que al utilizar las concentraciones más altas de la toxina en el cultivar susceptible, las micro secciones transversales se tornaron de color oscuro y solo un pequeño porcentaje sobrevivió. Las plantas del cultivar Williams se desarrollaron en forma normal, sin ninguna evidencia de desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

Las investigaciones de Busogoro *et al.* (1999), para determinar el efecto de las toxinas de *M. fijiensis* en el desarrollo de la Sigatoka negra y su aplicación como método de selección rápida de genotipos de *Musa*, con la toxina purificada juglone de *M. fijiensis*. La toxina fue aplicada a diferentes concentraciones sobre cloroplastos aislados de las células del mesófilo de plantas de los cultivares Fougamou (PR) y Gran Enano (S). Los resultados mostraron un efecto inhibitorio directo del juglone sobre la habilidad de los cloroplastos para transferir electrones, siendo más alto en el cultivar susceptible Gran Enano. Se encontró, un efecto represivo del juglone sobre la enzima dismutasa superóxidas (SOD) involucrada en mecanismos de defensa implicados en la oxidación de tejido y producción de necrosis, en Gran Enano (Anexo 7).

Colmenares *et al.* (2002), también realizó investigaciones para evaluar el efecto de las toxinas extraídas de *M. fijiensis*, sobre las células del mesófilo de cv. Yangambi Km5 (AAA-R), FHIA-02 (AAAA-PR) y Williams (AAA-S). Se determinó que en el cultivar susceptible Williams, ocurrió una acelerada muerte celular a las 24 horas de evaluación a pequeñas concentraciones de la toxina.

No obstante, existen pocos resultados prácticos del empleo de estas metodologías, es una herramienta valiosa e indispensable para la selección temprana de resistencia a una

enfermedad. La aplicación de filtrados concentrados o de la fracción cruda del patógeno, es un método eficaz que produce resultados en menor tiempo y facilita la identificación de diversos cultivares según su grado de resistencia y/o susceptibilidad. Además, permite medir la virulencia en términos cuantitativos y ofrece la posibilidad de generar nuevos variantes con niveles altos de resistencia a un determinado patógeno o plaga, que podría ofrecer mayor rendimiento a nivel de campo (Gómez 1998).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del estudio

El trabajo se realizó en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el cantón de Turrialba, Provincia de Cartago, Costa Rica, localizado a 9°63'N y 83°38'O a 602 m.s.n.m. La parte experimental, se llevo a cabo en los Laboratorios e invernaderos de la Unidad de Fitoprotección. La recolección de cepas de *M. fijiensis*, se visitó diferentes regiones de la Costa Atlántica y Central de Costa Rica.

3.2. Material vegetal experimental: variedades de plátano

Los clones de plátano, que se utilizaron en esta investigación, fueron obtenidos en los Laboratorios de Biotecnología de CATIE y Agrobiotecnología S.A. (cortesía del Dr. Oscar Arias). Se utilizaron plantas provenientes de cultivo *in vitro*, para asegurar la uniformidad del material experimental y su adecuado estado fitosanitario. Los siguientes, son los cultivares de plátano que se emplearon en esta investigación: FHIA-21 (AAAB), clasificado como altamente resistente a Sigatoka negra y Curraré (AAB) (características en Anexo 2), caracterizado por ser susceptible a la Sigatoka negra.

3.2.1. Micropropagación, enraizamiento y aclimatación

Los diferentes cultivares, fueron obtenidos con sistema radical desarrollado (fase IV). Estas plántulas fueron sometidas a una fase de endurecimiento y posteriormente llevadas a aclimatación hasta que alcanzaron las cinco hojas funcionales. Esta etapa tomo alrededor de 8 semanas y se siguieron las recomendaciones de Riveros (1995) para los pasos bajo condiciones controladas de invernadero.

3.2.2. Material fúngico: *M. fijiensis*

Se realizó la colecta de aislados de *M. fijiensis* en diferentes zonas de Costa Rica, con diferentes niveles de incidencia a la Sigatoka negra, específicamente las localidades de: Peralta, Fortuna y Montaña (Zona Central), Muelle (Zona Norte), Sixaola, Estrella, Matina, Sarapiquí, Santa Clara y Expaca (Zona Atlántica). En cada sitio se tomaron 20 muestras en cada finca, para obtener finalmente un muestreo representativo de las 10 localidades. Se

llevaron registros detallados sobre: fecha, hora de la colecta, cultivar hospedero, genotipo, localidad y altitud del área. Las muestras (con necrosis y peritecios maduros) fueron introducidas en bolsas de papel perforadas, etiquetadas, selladas y traídas al Laboratorio. Las cepas provenientes de las localidades de Sarapiquí, Estrella y Sixaola fueron facilitadas por el Dr. Galileo Rivas (CATIE, Depto. de Agricultura y Agroforestería).

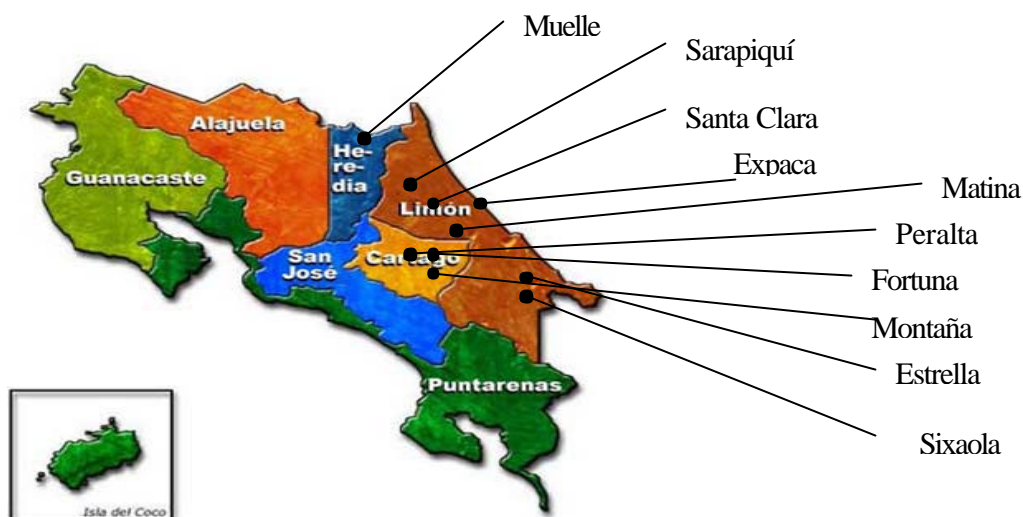


Figura 3. Procedencia de las cepas de *M. fijiensis* en estudio (fuente: www.nacion.com/ln_ee/costarica/mapag.jpg).

3.3. Obtención de cultivos monospóricos de *M. fijiensis*

Las cepas, fueron aisladas a partir de material foliar de plátano infectado (Curraré) que presentó el estado 6 de evolución de la enfermedad (Fouré 1985). El material seco se observó en el estereoscopio y los tejidos con peritecios viables fueron recortadas en pequeños recuadros (2 x 2 cm) y grapados sobre papel “bond” para luego ser llevadas a la cámara húmeda de 24 a 48 horas.

Finalizado este paso, el papel “bond” con los recuadros fue humedecido en agua estéril por un período de 30 minutos. Los fragmentos de hoja infectados fueron sometidos al método de descarga de ascosporas, sobre una caja Petri que contenía una solución acuosa al 2% de Agar-agua. Después de 24 horas, las ascosporas liberadas, que lograron germinar fueron individualizadas y transferidas al medio nutritivo Papa Dextrosa Agar (PDA Bacto Difco Laboratorios), luego se llevaron a incubación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en la oscuridad durante 7 días, tiempo en el cual se desarrollaron las colonias (Hoja técnica revista MTP 1999).

Las colonias obtenidas del hongo, fueron transferidas a platos individuales con medio Mycophil Agar (BBL, MycopilTM Agar) e incubadas durante 20 días en la oscuridad a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, para estimular el crecimiento micelial. Transcurrido este tiempo, cada colonia formada se colocó en un tubo de ensayo con 3 ml de Tween 0.05~ y se sometió a agitación en un vortex para mezclar vigorosamente por un periodo de 3 a 5 minutos con el fin de desprender fragmentos del micelio. Posteriormente, con una micropipeta se tomó una alícuota de 250 μl o aprox.10 gotas por caja y con un asa de vidrio fueron rayadas sobre la superficie de la caja Petri conteniendo medio nutritivo V8 (jugo V8 100 ml, CaCO_3 2 gr, Agar 15 gr, pH = 6).

Finalmente, las cajas Petri se sellaron e incubaron con luz continúa por 7 días a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para estimular la esporulación conidial. Transcurrido este tiempo, se observó la formación de numerosas colonias a partir de las cuales se obtuvieron subcultivos. Los aislados obtenidos a partir de los subcultivos, fueron conservados en crio-tubos a -20°C como fragmentos de micelio inmersos en una solución de glicerol al 10%. Paralelamente, estas cepas fueron mantenidas por cultivos sucesivos en cajas Petri sobre medio de cultivo V 8.

3.3.1. Preparación de la fracción cruda de *M. fijiensis* en germinación

Se siguió la metodología recomendada por Riveros (2002), donde los cultivos monospóricos esporulados obtenidos de cada cepa, se dejaron crecer en medio V8 durante 8 días a 26°C .

En cámara de flujo laminar, con cultivos de edad 8 días, se preparó una suspensión conidial homogénea, la cual se hizo pasar por filtros de etamina para eliminar fragmentos grandes de micelio. Se calibro la suspensión a 2×10^5 conidios/ml. Luego, se distribuyeron en erlenmeyers de 1l, 500 ml de la suspensión, se rotularon y se cubrieron con papel aluminio para someterlos a agitación horizontal (100 ciclos/min) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas. La suspensión conidial así obtenida se pasó por filtros Wathman de diferentes diámetros, utilizando el sistema de filtración vacío. De esta manera el líquido de coloración amarillo-clara-transparente resultante, se rotuló como la fracción cruda de *M.fijiensis* (FcMf). El filtrado obtenido, fue sometido a rotaevaporación (HaakeBuchler 2000 rev/ 30 min) concentrando la FcMf de 500 a 100ml y posterior liofilización (Eyela 0.01 TORR 100ml / 5 horas) hasta estado sólido, donde por 1l de FcMf se obtuvo un liofilizado sólido de aproximadamente 0.1 gr.

3.3.2. Preparación de células del mesófilo a partir de tejido foliar de musáceas

Se utilizó la técnica de Riveros y Acuña (2002), se seleccionó la hoja número dos de cada uno de los cultivares en estudio. Las hojas fueron lavadas, secadas y eliminados sus extremos. A la hoja, se le retiró la nervadura principal. Se obtuvo así los dos semilimbos, los cuales fueron pesados (1g) y seccionados paralelamente a la nervadura secundaria (3X15 mm). Se sumergieron los fragmentos de hojas en el medio M1 (Anexo 3), por 15 min. Luego, fueron transferidos al medio M2 (Anexo 3), y se sometieron a infiltración al vacío (580 mmHg) durante cuatro pulsos de 5 segundos.

Posteriormente, en beakers de 100 ml se les adicionó 25 ml de medio M3 (Anexo 3), donde se transfirió el material proveniente del paso anterior y se colocó en un agitador horizontal (50 ciclos/min) a una temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante una hora para facilitar la digestión; luego, se transfirió el material a cajas Petri pequeñas (60 x15 mm) que contenían 2 ml de medio M4 (Anexo 3). El tejido fue macerado suavemente con la ayuda de una pinza de punta roma, para individualizar las células del mesófilo, esta operación se repitió 4 veces, la suspensión se colocó en tubos cónicos de centrifuga y se le permitió la centrifugación (Damon IEC division) a 3000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur plástica y la pastilla de precipitación fue resuspendida en 3 ml de medio M4.

Para la tercera centrifugación, solo se adicionan 5 ml de medio M4. Las células del mesófilo (CM) preparadas, fueron conservadas bajo incubación en cajas para manejo de protoplastos (14 x10 cm) de 24 sitios y se mantubieron en oscuridad a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar el montaje de pruebas biológicas.

3.4 Método estándar

Este método se utilizó tanto para la clasificación y selección de mayor capacidad de virulencia de las cepas de *Mycosphaerella fijiensis* como para pruebas de patogenicidad con la cepa seleccionada sobre los dos cultivares.

Se utilizó la misma metodología utilizada por Burgeff (1991), Beveraggi (1992) y Riveros (1995), donde plantas con 5 hojas funcionales, provenientes de cultivo *in vitro* de cada uno de los cultivares fueron inoculadas con una suspensión conidial de *M. fijiensis* ajustada a una concentración de 2×10^5 conidios/ml. Para la calibración de la suspensión con cultivos del

hongo de 8 días de edad, se utilizó un hemacitómetro de Neubauer.

La aspersión, se realizó con un nebulizador Devilbiss ligado a un compresor de vacío. Las plantas recibieron dos presiones de inóculo con 15 minutos de intervalo y este procedimiento se efectuó en horas de la mañana. Después de la inoculación y con las hojas secas, las plantas fueron colocadas en una cámara humedad relativa > 95% durante 72 horas, ajustándole un timer con intervalos de 15 min con humedad y 45 min sin humedad cada dos horas, para lograr la humectación foliar requerida para la germinación de la conidia y penetración de tubos germinativos.

Luego de este tiempo las plantas fueron aleatorizadas y ubicadas en otros espacios adaptados en el invernadero para continuar el desarrollo y la evolución de los síntomas de la enfermedad. Por cada día de muestreo se tomaron dos plantas como repeticiones de cada uno de los cultivares en estudio.

Las muestras fueron colectadas los días 5, 7, 9 y 11, después de la inoculación. Se tomaron cuatro discos de cada hoja, los cuales se colorearon por el envés con una gota del colorante azul de algodón, durante 30 minutos de coloración y seguidamente, se llevaron a un portaobjeto con una gota de glicerina, se cubrió con el cubreobjeto, se le retiró los excesos del colorante y se realizó la observación bajo el microscopio de luz. De cada planta, se analizaron cuatro discos y por cada disco 5 campos microscópicos fueron leídos con objetivo de 40X. Se registraron: (a) el número de conidios germinados/campo microscópico; (b) número de estomas penetrados/campo microscópico; (c) número de estomas penetrados con células de guarda necrosadas/campo microscópico y (d) se analizó el desarrollo prolongado de síntomas con la escala de Fouré (1985).

En la primera parte de este trabajo, que consistió en la selección de la cepa de *M. fijiensis* más virulenta únicamente se hizo seguimiento hasta el día 21, con intervalos de dos días. Para la metodología del método estándar, se hizo la lectura de síntomas según Fouré (1985) hasta el día 45 después de la inoculación, con intervalos de cinco días.

3.4.1. Método células del mesófilo de tejido foliar

Partiendo de las células del mesófilo (CM) preparadas como aparecen en esta metodología (ver acápite 3.2.2) y con la FcMf (ver acápite 3.3.1.) Se prepararon cinco diluciones de FcMf, con el propósito de establecer un gradiente de variación, hasta completar la cantidad de 400 μ l de células del mesofilo y se considero un testigo sin FcMf para realizar los análisis.

Las CM, fueron dispensadas en una caja para manejo de protoplastos con 24 pozos (14x10 cm), se contó con cuatro repeticiones por tratamiento (Tabla 2).

Cuadro 2. Diferentes diluciones de FcMf con células del mesófilo de los cultivares FHIA-21 y Curraré

Tratamientos	Células del mesofilo (μl)	FcMf (μl)
T0	400	0
T1	360	40
T2	320	80
T3	280	120
T4	240	160
T5	200	200

Seguidamente, se procedió a sellar los bordes de las cajas con papel parafilm y cubrir con papel aluminio, rotulando con nombre del cultivar, fecha y hora de la preparación, para finalmente incubarlas a $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ir bloqueando el proceso a las 24, 48 y 72 hrs. Después de poner en contacto las CM con la FcMf en las diluciones respectivas, se realizaron las lecturas de viabilidad de CM utilizando la cámara de Burker. Las preparaciones fueron visualizadas mediante un microscopio de luz.

Las CM, que son alargadas y mantengan cloroplastos verdes son las viables, las que aparecen oscuras se consideraron como muertas, las células que aparecieron con deformaciones internas de los cloroplastos, pero que aún conservan el color verde fueron clasificadas como células con cloroplastos deformes. Finalmente, el porcentaje de células viables se expresa en relación al número de células vivas frente al total de células contadas por milímetro utilizando la siguiente fórmula:

Porcentaje de Viabilidad = células vivas / células totales X factor de la cámara de Burker (20.000)

4. Diseño Experimental

Se utilizó dos tipos de diseño experimental. En el método estandar, se realizó un diseño de parcelas divididas para determinar cual de las 10 cepas de *M. fijiensis* seleccionadas presentaba una mayor virulencia comparando la reacción sobre cultivar resistente y el susceptible y para determinar el comportamiento de la cepa seleccionada en los cultivares en estudio.

En el método células del mesófilo, se utilizó un diseño irrestricto al azar en el tiempo (24, 48 y 72 hrs) para determinar pruebas de patogenicidad medidas a diferente tiempo para cada dilución de FcMf.

4.1. Modelo Matemático

4.1.1. Método Estandar

Se utilizó el modelo de parcelas divididas, el cual toma en cuenta que dentro de cada parcela grande se aleatorizan los niveles del factor B (cepas), lo que viene a constituir las subparcelas y este proceso genera el error del factor B, donde la parcela grande H representa al hospedero, resistente y susceptible, C representa las cepas y la interacción HC se refiere a la interacción cepa-hospedero. Las cepas, representan los tratamientos y se utilizaron 14 repeticiones por tratamientos (10 cepas en la etapa de selección de la cepa con mayor virulencia y 1 cepa en la segunda fase, con la cepa seleccionada).

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + E_{k(i)} + C_j + (HC)_{ij} + E_{k(ij)}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta (virulencia)

μ = Media general

H_i = Efecto del hospedero (factor A)

$E_{k(i)}$ = Error del hospedero

C_j = Efecto de la cepa (factor B)

$(HC)_{ij}$ = Efecto de la interacción cepa hospedero

$E_{k(i)}$ = Error de la cepa

Se establecieron las siguientes hipótesis:

Ho: $S a_i = 0$ vs El tipo de hospedero ejerce un efecto significativo sobre la virulencia de las cepas de *M. fijiensis*.

Ho: $S B_j = 0$ vs La virulencia de las cepas de *M. fijiensis* ejercen un efecto significativo en ambos tipos de hospedero.

Ho: $S (aB)_{ij} = 0$ vs Existe un efecto de interacción significativo entre el hospedero y la virulencia de las cepas de *M. fijiensis*.

4.1.2. Método células del mesófilo

Se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar, el cual es un diseño en el que los tratamientos son asignados completamente al azar a las unidades experimentales, y un diseño de tratamientos factorial donde se consideran como factores el cultivar, el tratamiento (concentraciones) y las horas. Se establecieron 6 tratamientos, que incluyen un testigo y cinco diluciones de la fracción cruda de la cepa de *M. fijiensis* seleccionada, con 12 repeticiones.

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + T_j + H_k + DT_{ij} + DH_{ik} + TH_{jk} + DTH_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta (viabilidad de las células)

μ = Media general

D_i = Efecto de la dilución de la solución

H_k = Efecto de las horas de lectura

T_j = Efecto del tiempo

DT_{ij} = Efecto de la interacción entre la dilución de la solución y el tiempo

DH_{ik} = Efecto de la interacción entre la dilución y las horas de lectura

TH_{jk} = Efecto de la interacción entre el tiempo y horas de lectura

DTH_{ijk} = Efecto de la interacción entre la dilución de la solución, el tiempo y las horas de lectura.

E_{ijkl} = Error aleatorio de la variación experimental en el tiempo.

Se establecieron las siguientes hipótesis:

$H_0: \mu = \mu \dots$, Todos los tratamientos son iguales entre sí.

$H_a: \mu \neq \mu \dots$, Al menos un par de tratamientos difieren entre sí.

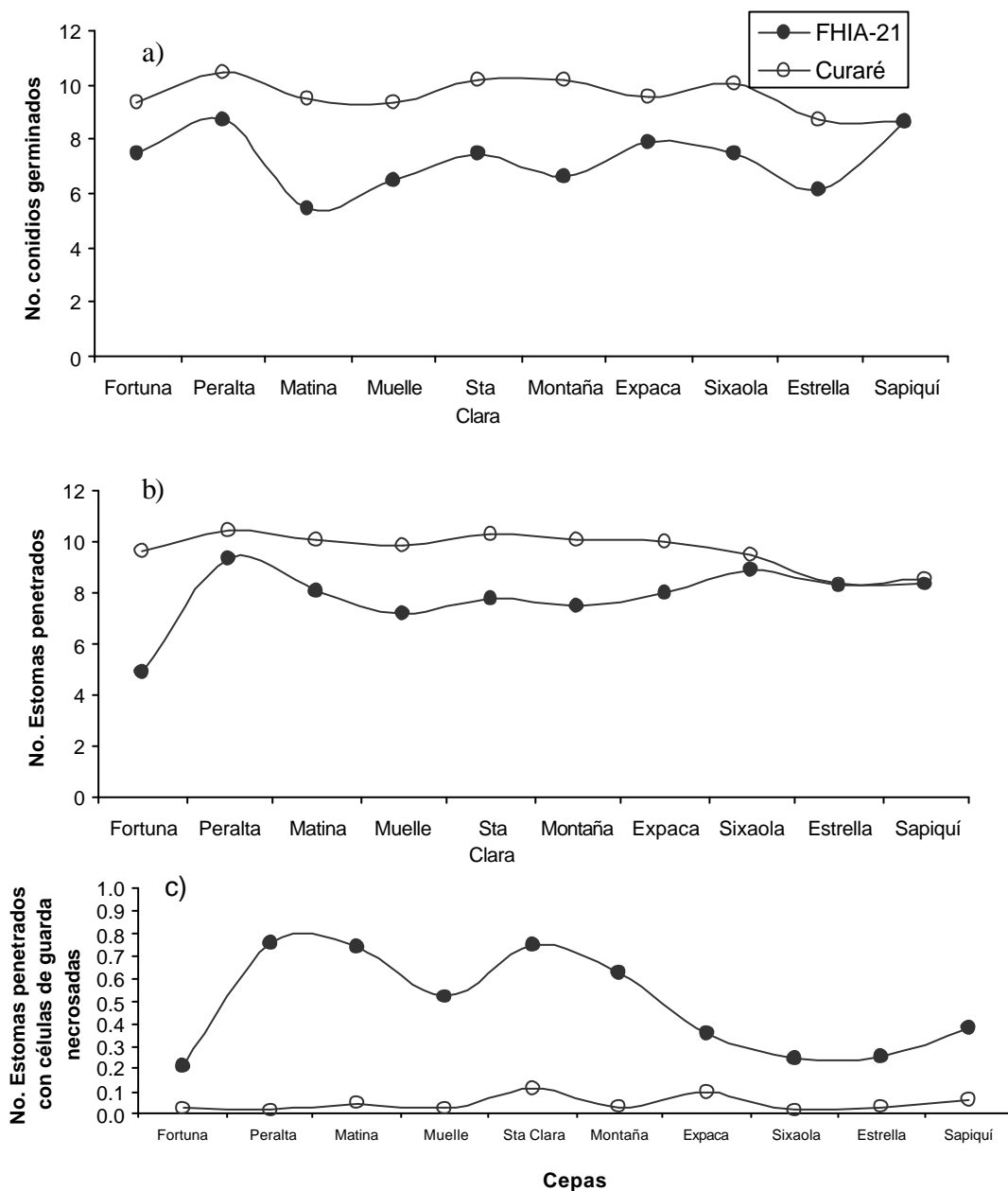
Todos los análisis realizados para este experimento, se hicieron utilizando el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System).

5. Resultados y Discusión

5.1. Método Estandar

5.1.1 Selección de la cepa costarricense de *M. fijiensis* con mayor nivel de virulencia a la Sigatoka negra

Figura 4. Comportamiento de las 10 cepas analizadas en los cultivares de plátano FHIA-21 (R) y Curaré (S), en relación con las variables: a) Número de conidios germinados; b) Número de estomas penetrados y c) Estomas penetrados con células de guarda necrosadas. A los días 5, 7, 9 y 11 después de la inoculación.



La figura 4, muestra el análisis comparativo de la inoculación de 10 cepas de *M. fijiensis* aisladas en diferentes localidades de Costa Rica, correspondientes a: Peralta, Fortuna y “La Montaña” (Zona Central), Muelle (Zona Norte), Sixaola, Estrella, Matina, Sarapiquí, Santa Clara y Expaca (Zona Atlántica), sobre los cultivares de plátano Curraré (S) y FHIA-21 (R) (figura 2).

En el caso a) de la figura 4, sobre la variable número de conidios germinados (NCG), el análisis estadístico para la interacción cepa-cultivar-planta, no presentó diferencias significativas ($p > 0.01$) (Anexo 8). Esto coincide con los resultados obtenidos por Riveros (1995) para los cultivares de banano Yangambi Km5 (YKm5) resistente y Gran Enano, susceptible. En el cual en los primeros días después de la inoculación no se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de conidios germinados entre los dos cultivares.

Dado el crecimiento abundante de los tubos germinativos y la formación de ramificaciones miceliales, esta variable solo pudo ser medida en las primeras etapas de la infección. No existen diferencias significativas ($p > 0.01$) (Anexo 8) en el comportamiento de las 10 cepas analizadas frente a un cultivar en particular. Todos los aislamientos, mostraron similar desarrollo de conidios germinados.

Para la interacción entre cultivares, se observaron diferencias significativas ($p < 0.0099$) (Anexo 8), lo que indica, un mayor desarrollo de NCG en el cultivar Curraré (susceptible), comparado con el cultivar FHIA-21 (resistente). Esto es contrario a los resultados obtenidos por Riveros (1995), donde esta variable fue medida a los 3 días después de la inoculación y en este caso, la lectura se realizó a los 5 días. Sin embargo, debido a la poca información obtenida para el análisis de dicha variable, se procedió a realizar la prueba de T de student, con el propósito de establecer el orden jerárquico descendente de la interacción. Para FHIA-21 las cepas con mayor NCG fueron las provenientes de las localidades de Peralta y Sarapiquí, mientras que para el cultivar Curraré, fueron Peralta, Montaña y Santa Clara.

En relación al caso b) de la figura 4 sobre el número de estomas penetrados (NEP), el análisis estadístico, no determinó diferencias significativas ($p > 0.01$) (Anexo 8), para la interacción cepa cultivar. Mientras que para la interacción entre cultivares se presentan diferencias significativas ($p < 0.0001$) (Anexo 8). Se observó mayor NEP en el cultivar Curraré

que en FHIA-21 (a partir del día 7 de evaluación), respuesta que difiere con los resultados obtenidos por Beveraggi (1993) en cultivares de banano. El autor, no observó diferencias significativas en cuanto a la penetración del micelio en los estomas en el día 8 de evaluación para ninguno de los cultivares de banano comparados. Mientras que Riveros (1995), comparando los mismos cultivares de banano, no observó diferencias significativas para esta variable a los 7 y 9 días de evaluación en ninguno de los cultivares analizados, con un efecto de inhibición en el desarrollo del micelio del hongo y capacidad de penetración en los estomas del cultivar resistente a partir del día 11 de evaluación.

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Tapia *et al.* (1989), quienes mostraron que la mayor o menor resistencia a *M. fijiensis*, puede estar asociada con la densidad estomática del cultivar. Sin embargo, únicamente para el cultivar FHIA-21, se observó una regresión lineal entre las variables NCG y NEP ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.25$). Posiblemente debido a un bloqueo de desarrollo del micelio del patógeno a partir del día 9 de evaluación, lo cual puede estar relacionado con los resultados obtenidos por Beveraggi (1993) y Riveros (1995) para el cultivar YKm5.

En el caso de Curraré, no se observó una regresión lineal ($p > 0.9818$). Los datos mostraron una tendencia 1:1 en función de las variables analizadas. Esto podría explicarse por la existencia de un mayor número de estomas en este cultivar (Anexo 4), lo cual favorecería los eventos de penetración de *M. fijiensis*, sobre el filoplano de las hojas, debido a la proximidad de los estomas entre sí. Las cepas con mayor NEP fueron Peralta, Santa Clara, Montaña y Sixaola, para el cultivar FHIA-21, fueron Peralta y Sarapiquí. Se puede afirmar que la cepa de Peralta fue la que obtuvo mayor registro de NEP.

Para el caso c) de la figura 4, la variable número de estomas penetrados con células de guarda necrosadas (CGN), presentó diferencias significativas en la interacción cepa-cultivar ($p < 0.0001$) (Anexo 8). Se observó un mayor número de CGN en el cultivar FHIA-21(R), respuesta que podemos relacionar con lo observado por Sallé *et al.* (1989), Beveraggi (1993) y Riveros (1995), en el cultivar Ykm5 en etapas tempranas de desarrollo de la enfermedad. Este evento, ocurrió a los 7 después de la inoculación con *M. fijiensis*; mientras que, en Curraré, las CGN no se observaron diferencias significativas ($p > 0.01$) (Anexo 8), para esta variable a los 11 días después de la inoculación. Lo anterior sugiere que el proceso de colonización del hongo continua con mayor intensidad, similar a los resultados obtenidos

para el cultivar Gran Enano (S) por Salle *et al.* (1989), Beveraggi *et al.* (1993), Riveros *et al.* (1995).

En el cultivar FHIA-21, la mayor cantidad de CGN, se presentaron en las cepas provenientes de Peralta, Santa Clara y Matina (Anexo 5.). Esta variable, fue determinante en la selección de la cepa con mayor virulencia, debido a que la necrosis como reacción rápida de defensa celular de la planta, asociada a la inhibición del patógeno, osea, reacción hipersensible. Esta respuesta representa la activación de los mecanismos de defensa de la planta y reconocimiento del patógeno (Salle *et al.* 1989, Beveraggi *et al.* 1993, Riveros *et al.* 1995).

Esta señal celular, se considera un indicador del nivel de resistencia al patógeno, en el marco de una relación parasitaria incompatible. Mientras que en el cultivar susceptible, ocurre una reacción compatible, el reconocimiento del patógeno no se lleva cabo y la respuesta de defensa no es activada. Por lo que el patógeno puede colonizar al hospedante y la enfermedad se establece (Agrawal *et al.* 1999, Keen *et al.* 1990). En el cultivar Curraré, no hubo diferencias significativas ($p > 0.01$) (Anexo 8) para la variable CGN, al día 11 después de la inoculación, lo cual sugiere que el cultivar no reconoció al patógeno y este continuó su proceso de colonización en los espacios intercelulares del cultivar.

Para determinar la severidad de la infección de las cepas de *M. fijiensis* en los cultivares de plátano FHIA-21 y Curraré, se realizaron observaciones macroscópicas a partir del día 12 después de la inoculación con intervalos de 4 días hasta el día 28, siguiendo las descripciones establecidas por el índice de Fouré (1998).

En el cultivar FHIA-21, se observaron las primeras lesiones, correspondientes al estadio 2 de desarrollo la enfermedad, en el día 16 después de la inoculación del patógeno. En la mayoría (8 cepas) de las cepas estudiadas y se mantuvo el estadio 2 hasta el día 28 de evaluación, lo cual puede estar relacionado con lo observado por Sallé *et al.* (1989), para el cultivar YKm5 y Alvarado *et al.* (2002), para el cultivar FHIA-21. Según estos trabajos, en el caso de los cultivares resistentes se frena el desarrollo de síntomas en etapas muy tempranas de la infección, el estadio 2 se mantiene hasta el día 20 después de la inoculación (Anexo 1).

En Curraré, las primeras lesiones necróticas en la mayoría de las cepas de *M. fijiensis* analizadas (7 cepas) se observaron el día 28 de evaluación, correspondientes al estadio 2 que corresponde a una etapa temprana de desarrollo de la enfermedad. Esto coincide con los estudios de Beveraggi *et al.* (1993) y Alvarado *et al.* 2002 en el cultivar Gran Enano, donde las primeras lesiones necróticas se observaron después del día 20. Sin embargo, para las cepas de Peralta y Sarapiquí presentaron ningún síntoma, lo cual sugiere que estas cepas presentan un alto grado de virulencia ya que hasta ese momento el hongo posiblemente continúa su proceso de colonización y desarrollo sin activar los mecanismos de defensa del cultivar (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Severidad de Sigatoka negra (Fouré 1985) con diferentes cepas de *M. fijiensis* inoculadas sobre el cultivar de plátano FHIA-21 del día 12 al 28 después de la inoculación.

Cepas	Días después de la inoculación				
	12	16	20	24	28
Fortuna	0	2	2	2	2
Peralta	0	2	2	2	2
Matina	0	2	2	2	2
Muelle	0	2	2	2	2
Santa Clara	0	0	1	2	2
Montaña	0	2	2	2	2
Expaca	0	0	1	2	2
Sixaola	0	2	2	2	2
Estrella	0	2	2	2	2
Sarapiquí	0	2	2	2	2

* Escala de Fouré : 1, 2, 3, 4, 5, 6 (Fouré 1985)

Cuadro 4. Severidad de Sigatoka negra (Fouré 1985) con diferentes cepas de *M. fijiensis* inoculadas sobre el cultivar de plátano Curraré del día 12 al 28 después de la inoculación.

Cepas	Días después de la inoculación				
	12	16	20	24	28
Fortuna	0	0	0	0	2
Peralta	0	0	0	0	0
Matina	0	0	0	0	2
Muelle	0	0	0	0	2
Santa Clara	0	0	0	1	2
Montaña	0	0	0	0	0
Expaca	0	0	0	0	1
Sixaola	0	0	0	0	1
Estrella	0	0	0	0	1
Sarapiquí	0	0	0	0	0

?? Escala de Fouré : 1, 2, 3, 4, 5, 6 (Fouré 1985)

De acuerdo a los criterios de evaluación, basados en la interacción de las 10 cepas analizadas en los dos cultivares de plátano: FHIA-21 (R) y Curraré (S), mediante la evaluación microscópica (Fig.4) y la respuesta presentada por los cultivares en cuanto ha desarrollo de lesiones necroticas (Cuadro 3 y 4), apoyándonos en trabajos realizados por Salle *et al.* (1989), Beveraggi *et al.* (1993) y Riveros (1995), sobre los efectos que determinan los niveles de virulencia del patógeno en cultivares de banano, con diferentes niveles de resistencia, se procedió a seleccionar la cepa “Peralta” para continuar con las pruebas de patogenicidad.

5.1.2. Evaluación de resistencia a *M. fijiensis* (cepa Peralta) – vs- cultivares de plátano FHIA-21 y Curraré:

El cuadro 5, muestra el análisis comparativo de inoculación de la cepa Peralta sobre los cultivares de plátano FHIA-21 (R) y Curraré (S), respecto a las variables analizadas.

Cuadro 5. Número de conidios germinados, número de estomas penetrados y número de células de guarda necrosadas, a los días 5, 9 y 11 después de la inoculación en los cultivares de plátano FHIA-21 (R) y Curraré (S) inoculados con la cepa Peralta.

Días después de la inoculación	Clon	Número de conidios germinados NCG	Número de estomas penetrados NEP	Número de estomas penetrados con células de guarda necrosadas CGN
5	FHIA-21	5.70 ± 0.32	3.50 ± 0.41	—
	Curraré	9.70 ± 0.83	7.53 ± 0.66	—
7	FHIA-21	—	7.98 ± 0.30	0.88 ± 0.28**
	Curraré	—	9.33 ± 0.72	0.00
9	FHIA-21	—	9.10 ± 0.39	1.00 ± 0.55**
	Curraré	—	11.58 ± 0.56	0.00
11	FHIA-21	—	11.70 ± 0.4	2.50 ± 0.65**
	Curraré	—	11.80 ± 0.35	0.00

**Diferencias significativas

_ Sin Lectura

Para la variable número de conidios germinados (NCG) (Cuadro 5), no se observaron diferencias significativas ($p > 0.01$) (Anexo 8), al día 5 después de la inoculación, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Riveros (1995) con los cultivares de banano de referencia YKm5 (R) y Gran Enano (S), donde no se presentaron diferencias significativas para esta variable a los 3 días después de la inoculación. La variable NCG solo puede ser medida hasta los primeros 5 días después de la inoculación, ya que luego de esta etapa los tubos germinativos del patógeno estaban más desarrollados y eso hace muy difícil su cuantificación.

Para la variable, número de estomas penetrados (NEP) (Cuadro 5), no se observó diferencias significativas ($p > 0.01$) (Anexo 8), entre los cultivares, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Beveraggi *et al.* (1993) y Riveros (1995), donde se reporta que para el día 11 después de la inoculación el hongo continúa su penetración en la cavidad de los estomas. Se sugiere, que el hongo continúa su proceso de colonización al interior de los espacios intercelulares en los dos cultivares comparados.

En el caso del número de estomas penetrados con células de guarda necrosadas (Cuadro 5), los análisis estadísticos, determinaron diferencias significativas para la interacción cepa-cultivar ($p < 0.0001$). Se observó la presencia de CGN en el cultivar FHIA-21 (R), mientras que en Curraré (S), no se observaron CGN al día 11 después de la inoculación. Esto coincide con los resultados anteriores y se considero como respuesta hipersensible del cultivar FHIA-21(R) (Salle *et al.* 1989; Beveraggi *et al.* 1993 y Riveros 1995), la cual se presenta en etapas tempranas de la infección en el cultivar resistente.

Estadísticamente, se presentaron diferencias significativas ($P < 0.0009$) (Anexo 8), en la interacción CGN-días de lectura para ambos cultivares. En cuanto a que el cultivar FHIA -21 (R), las CGN comenzó a manifestarse a partir del 7 luego de la inoculación y continúan su desarrollo hasta el día 11 después de la inoculación. Mientras que para Curraré, no se presentaron CGN durante el tiempo de evaluación temprana, hasta el día 11 de evaluación. Lo que coincide con lo sugerido por De Wit (1987), en sus trabajos de relación parasitaria *Cladosporium fulvum* – tomate, donde encontró que en la relación compatible, la respuesta de defensa de la planta no es activada, el patógeno coloniza los espacios intercelulares de la cavidad de los estomas del hospedante y la enfermedad se desarrolla.

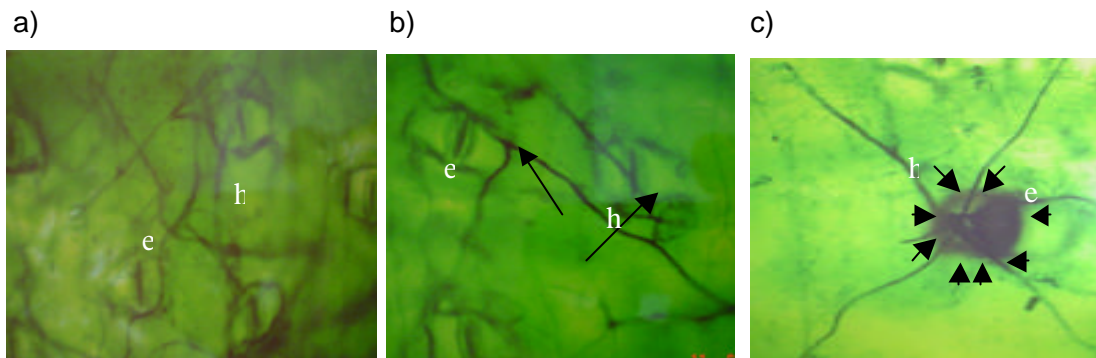


Figura 5. Diferentes estadios de desarrollo de *M. fijiensis* a) extensión del micelio de *M. fijiensis* sobre la hoja del cultivar Curraré a los 5 días después de la inoculación; b) sitios de penetración de *M. fijiensis* vía estomática de los tubos germinativos en crecimiento de *M. fijiensis* en el cultivar FHIA-21 a los 7 días después de la inoculación y c) sitio de penetración y célula de guarda necrosada (▼▼▼) en el cultivar FHIA-21 a los 11 días después de la inoculación. Todas las fotos fueron tomadas con objetivo de 10 X . A. Díaz, Turrialba, Costa Rica, 2003. h=hifa e= estoma.

Observaciones macroscópicas, según la escala de Fouré (1985), para medir el desarrollo de lesiones necroticas sobre el tejido foliar de los cultivares FHIA-21 y Curraré a partir del día 15 después de la inoculación con la cepa Peralta de *M. fijiensis*, con intervalos de 5 días hasta el día 45, con el fin de dar seguimiento a los síntomas, en estado avanzado de desarrollo de la enfermedad, permitieron establecer diferenciación de niveles de resistencia en ambos cultivares comparados (Cuadro 5).

En FHIA-21, el estadio 2 de severidad, fue el nivel más alto observado, presentándose en el cultivar a los 15 días después de la inoculación, el cual se mantuvo hasta el día 45 después de la inoculación. En el cultivar Curraré, las primeras lesiones (estadio 2) ocurrieron al día 30 después de la inoculación. A los 35 días, se observó un aumento en diámetro de la lesión, clasificada dentro del estadio 3 de severidad. A los 45 días después de la inoculación, la lesión alcanzó el estadio 4 (Cuadro 5).

Un análisis de área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), determinó que efectivamente, el cultivar Curraré, acumuló 70 unidades de enfermedad con respecto a 63 unidades de enfermedad del material resistente FHIA-21. Este resultado, destaca la interacción patógeno-hospedante en el cultivar resistente (Anexo 6).

Cuadro 6. Severidad de Sigatoka negra (Fouré 1985) y ABCPE sobre los cultivares de plátano FHIA-21 (R) y Curraré (S) inoculados con la cepa Peralta desde el día 15 hasta el 45 después de la inoculación.

Cultivar	Días después de la inoculación							ABCPE
	15	20	25	30	35	40	45	
FHIA-21	2	2	2	2	2	2	2	63
Curraré	0	0	0	2	3	4	4	70

* Escala de Fouré : 1, 2, 3, 4, 5, 6

Los resultados obtenidos con la cepa Peralta de *M. fijiensis*, en los cultivares FHIA-21 (R) y Curraré (S) (Cuadro 6), coinciden con los obtenidos en la fase de selección de la cepa con mayor nivel de virulencia y las investigaciones realizadas por Salle *et al.* (1989), Beveraggi *et al.* (1993), Riveros (1995) y Alvarado *et al.* (2002) en cuanto al desarrollo de lesiones necróticas en las interacciones *M. fijiensis*-reacción incompatible y *M. fijiensis*-reacción compatible, en cultivares de banano con diferentes niveles de resistencia.

Los resultados obtenidos, sugieren que el método estándar, puede ser considerado una herramienta útil y confiable para la selección temprana de resistencia en cultivares de *musáceas* con diferentes genomas y niveles de resistencia a la Sigatoka negra, provenientes de cultivos susceptibles transformados genéticamente o provenientes de métodos no-convencionales en la selección de resistencia al patógeno.

En los casos estudiados, es claro que los materiales evaluados como resistentes o parcialmente resistentes en campo (Anexo 7), se comportan de manera similar según el método estándar. Lo anterior, permite considerar el método estándar como una estrategia valiosa, en términos de confiabilidad y reproducibilidad de resultados, en los estudios de selección de patogenicidad. Estos estudios forman parte de los programas de mejoramiento genético convencional y/o no-convencional.

5.2. Método células del mesófilo : evaluación temprana de resistencia a *M.fijiensis* (cepa Peralta) en cultivares de plátano FHIA-21 y Curaré.

La figura 6 muestra los análisis comparativos entre los porcentajes de viabilidad de las células del mesófilo de los cultivares FHIA-21 (R) y Curaré (S), en relación a las células muertas y a las células con cloroplastos organizados anormalmente (CCOA), acompañadas por alteraciones a nivel de pared celular.

Se consideró como células muertas a aquellas que presentaban una coloración café. En la clasificación de células con cloroplastos organizados anormalmente y daño a nivel de pared celular, se agruparon las células que presentaban desorganización en la ubicación normal de los cloroplastos. Además de un aspecto abultado y ubicados en los extremos o parte central del citoplasma, pero conservaron su coloración verde.

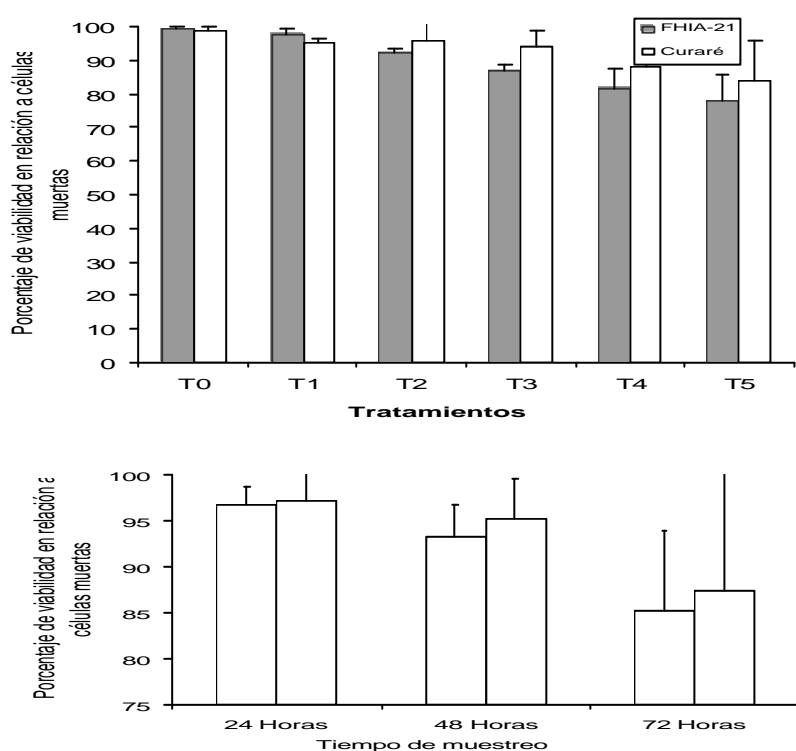


Figura 6. Porcentaje de viabilidad total de las células del mesófilo (CM) para los cultivares FHIA-21 (R) y Curaré (S) en relación a células muertas. a) por tratamiento y b) por hora de lectura. T0= CM 400 μ l - FcMf 0 μ l T1= CM 360 μ l - FcMf 40 μ l; T2= CM 320 μ l - FcMF 80 μ l; T3= CM 280 μ l - FcMf 120 μ l ; T4= CM 240 μ l - FcMf 160 μ l ; T5= CM 200 μ l - FcMf 200 μ l.

En la figura 6 a), se muestra el porcentaje de viabilidad en relación a las células muertas por tratamiento, para los cultivares FHIA-21 (R) y Curraré (S) al contacto con la FcMf. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre los cultivares, donde el testigo, independientemente del cultivar, presenta valores muy bajos de pérdida de viabilidad, alrededor de 95~ para todos los tratamientos.

En relación a los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5, con concentraciones de FcMf en forma progresiva, se observó en cultivar FHIA-21 (R) un aumento de las células muertas. Esto produce una pérdida de viabilidad en función de la concentración de FcMf. El cultivar Curraré, también registra valores de células muertas, pero nunca en la misma dimensión que el cultivar FHIA-21. Los análisis estadísticos, determinaron diferencias significativas ($p < 0.0001$), entre los tratamientos, a partir de T2 para los dos cultivares

La figura 6 b), referente al porcentaje de viabilidad en relación a las células muertas por horas de lectura (24, 48 y 72), para los cultivares FHIA-21 (R) y Curraré (S) al contacto con la FcMf, se presentaron se diferencias significativas ($p < 0.0001$), tanto para la variable horas de lectura como para los cultivares.

El cultivar FHIA-21, presentó los valores más altos de células muertas, con una disminución progresiva del porcentaje de viabilidad, a medida que avanzó el tiempo de incubación con la FcMF. El cultivar Curraré, también presentó células muertas, pero nunca en la misma proporción que el cultivar resistente FHIA-21; el mayor aumento en la cantidad de células muertas para el cultivar Curraré, se observó entre las 48 y 72 horas de incubación con la FcMf.

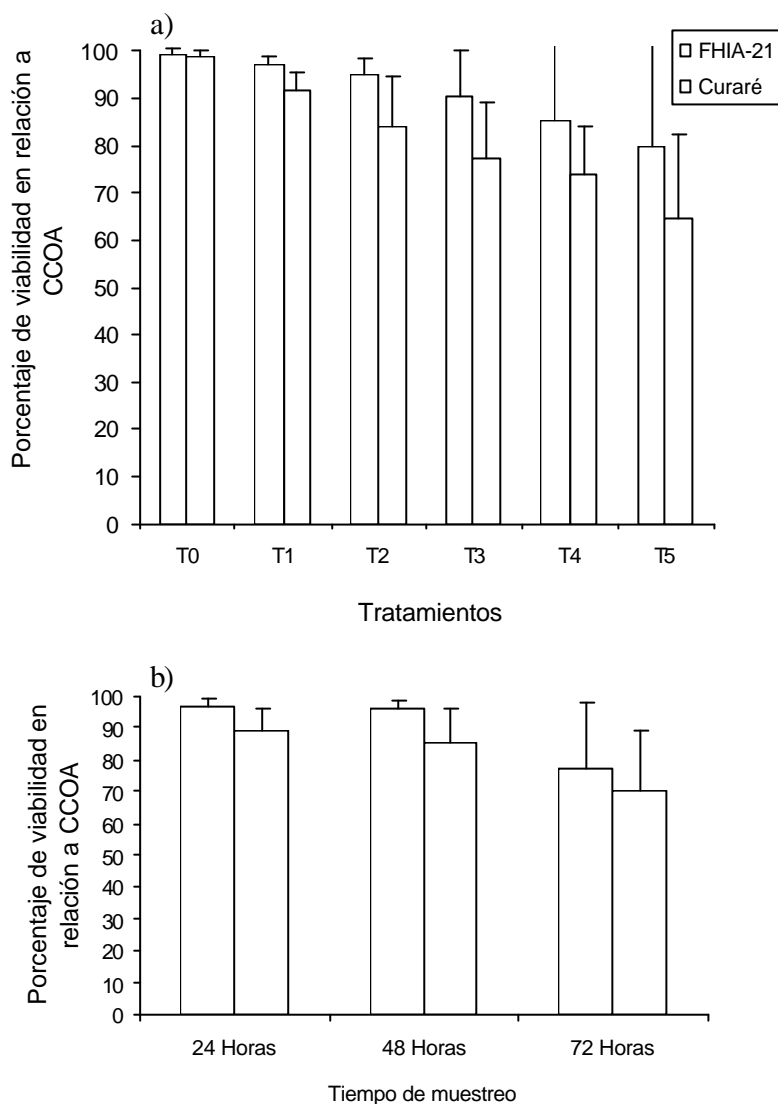


Figura 7. Porcentaje de viabilidad de las células del mesófilo de los cultivares FHIA-21 (R) y Curaré (S) en relación a células con cloroplastos organizados anormalmente acompañados con alteraciones a nivel de pared celular a) por tratamiento; b) por hora de lectura.

En la figura 7 a) y b), se muestra el porcentaje de viabilidad de las células con cloroplastos organizados anormalmente acompañados de alteraciones en la pared celular, de los cultivares de plátano y FHIA-21 (R) y Curaré (S) por tratamientos de FcMf (T1, T2, T3, T4 y T5) y horas de lectura (24, 48 y 72).

Se observaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los cultivares. Se presentó un mayor número de CCOA y daño de pared celular en el cultivar susceptible Curaré a partir del T1 desde las 24 horas de lectura y fue mayor con el aumento de las concentraciones de

FcMf. En FHIA-21, se pudo observar estas deformaciones celulares en pequeñas proporciones solo a partir de las más altas concentraciones de FcMf, T3, T4 y T5 a partir de las 48 horas de lectura.

En el caso del testigo, al cual no se le aplicó FcMf, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.01$) para la variable CCOA con alteraciones de la pared celular para ninguno de los dos cultivares, con porcentajes de viabilidad alrededor de 96~.

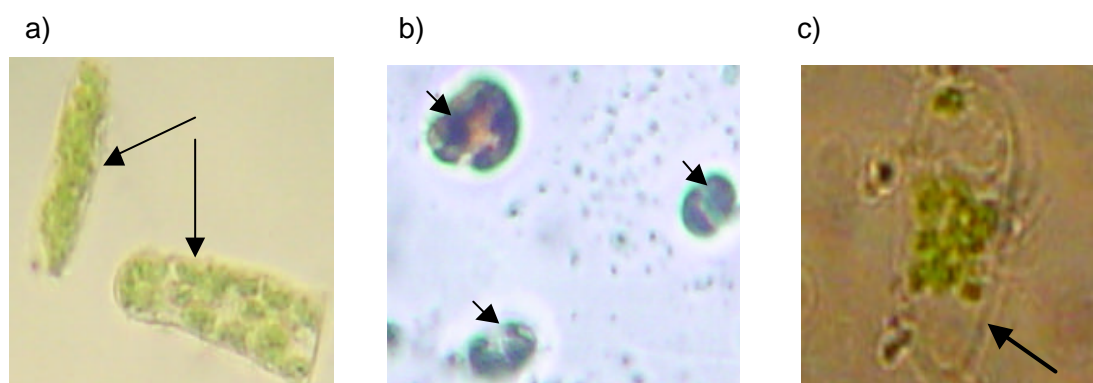


Figura 8. Ilustra preparaciones de suspensión de células del mesófilo tratadas con la FcMf. a) Célula viva, con cloroplastos bien diferenciados y situados en la periferia en contacto con la membrana plasmática control (↓), b) Célula muerta cultivar FHIA-21, a las 48 horas (▼) y c) célula con cloroplastos dispersos alrededor del citoplasma en el cultivar Curraré a las 24 horas (↓). Todas las fotos fueron tomadas con objetivo de 10 X. A. Díaz, Turrialba, Costa Rica, 2003.

Según las observaciones en el microscopio de luz, las células del mesófilo en ambos cultivares presentaron una apariencia muy similar, con células alargadas pertenecientes al parénquima de empalizada y células más redondeadas con formas irregulares que corresponden al parénquima esponjoso. Cloroplastos de color verde y distribuidos internamente en la periferia de la célula en contacto con la membrana plasmática.

En general, la pérdida de viabilidad con relación a células muertas, fue mayor en el cultivar resistente FHIA-21 que en el susceptible. Mientras que, la presencia de células con cloroplastos organizados anormalmente y alteración de la pared celular, fue determinante en el cultivar susceptible Curraré. Aunque, se presentó en el cultivar resistente, nunca alcanzó la misma magnitud.

Tanto en el análisis de las células cloroplásticas muertas, como en el de CCOA, se muestra que a medida que aumenta progresivamente la concentración de la FcMf y el tiempo de incubación, en ambos cultivares se observan menores porcentajes de viabilidad.

Los resultados para la variable células con células con cloroplastos organizados anormalmente y alteración de la pared celular para el cultivar susceptible Curraré, coinciden con los obtenidos por Bussogoro *et al.* (1999), al trabajar con suspensiones de cloroplastos aislados de dos cultivares de banano Fougamou (ABB-PR) y Gran Enano (AAA-S), sometidos a diferentes concentraciones de la toxina juglone de *M. fijiensis*. Determinaron que el abultamiento celular es la primera anormalidad celular observada en el cultivar susceptible y que la pérdida de la habilidad de funcionamiento de los cloroplastos se ve reducida por el efecto de la toxina del patógeno. En el presente estudio, se coincidió en que los cloroplastos son la meta de acción de las toxinas producidas por el patógeno y que estos efectos se incrementan con la concentración.

En el caso anterior, donde el selector utilizado fue la toxina purificada tipo juglone, difiere con esta investigación, donde únicamente se trabajó con la FcMf sin pasar por ningún sistema de purificación, osea fracción cruda. Además, no se utilizó ningún tipo de solvente para realizar la extracción de la FcMf, se consideró la germinación de los conidios por 48 horas, bajo oscuridad y en agitación constante, como se menciona en la metodología.

Colmenares *et al.* (2002), quienes implementaron metodologías, basadas en la utilización de células del mesófilo y el efecto de la toxina de *M. fijiensis* extraída con cloroformo como solvente en cultivares de banano, Ykm5 (AAA) (R), FHIA-02 (PR) (AAA) y Williams (AAA) (S), con genomas diferentes a los cultivares empleados en esta investigación, estos autores, observaron resultados diferentes, en cuanto a que el cultivar susceptible presentó una mayor pérdida de viabilidad a las 24 horas, y no se pudo concluir si esta pérdida esta relacionada con el hecho de que se consideró la deformación de los cloroplastos como célula muerta, aunque otros trabajos así lo registran. En el caso de esta investigación se crearon categorías de reacción (células muertas y células con cloroplastos organizados anormalmente y alteración de la pared celular); las cuales se mencionaron anteriormente.

En esta investigación, se trató con cultivares de plátano, el susceptible Curraré (AAB) y FHIA-21 (AAAB) resistente, donde se encuentra la presencia del genoma Balbisiana (B) incorporado dentro de las constituciones genéticas de cada uno de los cultivares. En este sentido, Rowe y Richardson (1975), sugieren que la presencia del genoma B, podría ser el responsable de la ganancia de resistencia frente a la Sigatoka negra, con esto, no se sabría

exactamente si son comparables las respuestas de la células del mesófilo de los cultivares con genomas diferentes a los selectores, toxinas ó fracción cruda de *M. fijiensis*.

5.3. Comparación de métodos para evaluar patogenicidad

El cuadro 7, registra la información referente a costos por infraestructura y mano de obra, material vegetal (“vitro plantas”) y reactivos utilizados a lo largo de la investigación. Se estimó la reproducibilidad y confiabilidad de los dos métodos comparados, de acuerdo al tiempo requerido para su realización y rapidez en la señal de respuesta.

Para estimar la reproducibilidad del método estándar, se tuvo en cuenta, que el experimento fue realizado dos veces y se observó el mismo resultado. En el método de células del mesófilo, se realizaron las pruebas cuatro veces y se observó el mismo desempeño. Lo cual indica que hubo consistencia en los resultados obtenidos en cada una de las repeticiones.

En cuanto a la confiabilidad, se estableció como confiable al método estándar, ya que permitió separar las señales de respuesta del cultivar resistente y el susceptible.

Cuadro 7. Cuadro comparativo en términos de costos, reproducibilidad y confiabilidad, entre los métodos estándar y células del mesófilo, para realizar pruebas de evaluación temprana de resistencia a *M. fijiensis*.

Costos (U\$)						
Métodos	Infraestructura y mano de obra	Material vegetal	Reactivos	Duración en tiempo	Reproducibilidad	Confiabilidad
Estándar	1000.00	200.00	5.00	50 días	***	**
Células del mesófilo	150.00	25.00	200.00	3 días	***	*

Los costos de infraestructura y mano de obra incluyen gastos en: programas de fertilización, fitosanidad, riego y otros.

*** Repetitivo ** Confiable * Poco confiable

En el cuadro 7, se puede observar que el método estándar para la selección temprana de resistencia a *M. fijiensis* en cultivares de plátano, es más costoso en términos de inversión sobre el establecimiento de infraestructuras y debido a que se requiere de mayor cantidad de plantas para su implementación, se elevan los gastos en mano de obra. El tiempo requerido

para obtener respuesta en la señal es de aproximadamente 50 días, razón por la cual, no se considera un método lo suficientemente rápido de selección temprana de resistencia.

Sin embargo, se consideró como un método confiable de selección, ya que permite evaluar respuestas marcadas según el nivel de resistencia del cultivar.

El método de evaluación temprana de resistencia a nivel *in vitro*, utilizando fracción cruda de *M. fijiensis* sobre células del mesófilo aisladas de cultivares de plátano con diferentes niveles de resistencia, es menos costoso que el método estándar en relación a la inversión en infraestructura, mano de obra y compra de reactivos para su implementación. Permite realizar pruebas de patogenicidad de manera rápida, incluso antes de las 72 horas, con menor material vegetal. Sin embargo, se necesita mucha más investigación en relación al proceso de obtención de la fracción cruda de *M. fijiensis*. (FcMf), quizás aumentando la concentración de la suspensión conidial para generar un incremento en la señal de respuesta. Lo anterior, muestra que el método de selección de resistencia *in vitro*, no fue considerado como confiable, ya que no se observó una marcada diferenciación de los niveles de resistencia en los cultivares de plátano comparados. Sin embargo, ambos métodos, estándar y células del mesófilo son reproducibles.

Las pruebas de patogenicidad, en etapas tempranas de la infección, permiten la selección de material vegetal resistente a la Sigatoka negra, facilitando tanto los procesos de mejoramiento de las especies de Musa, como la selección de las plantas antes de ser establecidas a nivel de campo.

El método estándar de selección, ofrece la posibilidad, de diferenciar las respuestas relacionadas con la expresión de señales de resistencia en cultivares de Musa, resistentes y susceptibles. Ofrece la ventaja, de evaluar la expresión de los síntomas de desarrollo de la enfermedad de manera similar a la expresión de estos en campo, en menor tiempo que en condiciones naturales de infección. Sin embargo, el tiempo requerido, para obtener la expresión macroscópica de los síntomas, correspondientes a los diferentes estadios de desarrollo de la enfermedad es muy largo.

La aplicación *in vitro*, de pruebas de patogenicidad, es una alternativa prometedora, en la expresión temprana de resistencia o susceptibilidad a la Sigatoka negra, en términos de tiempo de respuesta, espacio requerido para el establecimiento de las pruebas, así como la

disponibilidad de utilizar menos material vegetal; sin embargo, este proceso requiere de más investigación, debido a que no se ha logrado establecer la cantidad adecuada de FcMf requerida para diferenciar niveles de resistencia a la enfermedad, de manera precisa. Los resultados obtenidos en esta investigación, podrían servir como referencia, para la utilización de la FcMf y en las células del mesófilo de los cultivares de Musa, resistentes y susceptibles para obtener rapidez en la señal de resistencia, aplicando mayor presión del agente selector.

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1. Conclusiones

1. Se seleccionó la cepa Peralta, como aquella con mayor nivel de virulencia para los cultivares de plátano FHIA 21 y Curraré. La cepa seleccionada, en la segunda fase del experimento, utilizando el método estándar, presentó un comportamiento similar al obtenido en la etapa de selección de virulencia, para todas las variables analizadas en ambos cultivares, permitiendo su diferenciación bajo condiciones controladas de invernadero.

2. Se desarrollaron dos métodos de selección temprana de resistencia. El método estándar en condiciones controladas de invernadero, permitió la identificación de la reacción hipersensible en el cultivar resistente FHIA-21, con la manifestación de células de guarda necrosadas alrededor de los sitios de penetración. El método de células del mesófilo a nivel *in vitro*, determinó que la FcMf ejerce un efecto directo sobre los cloroplastos de los cultivares de plátano y reduce el porcentaje de viabilidad de las células del mesófilo de manera progresiva, en función del incremento de la concentración.

3. El método estándar para la selección temprana de resistencia a *M. fijiensis* en cultivares de plátano con diferentes niveles de resistencia, es confiable y reproducible, ya que permite evaluar respuestas marcadas según el nivel de resistencia del cultivar. Esto representa un ahorro en tiempo y recursos en comparación con las pruebas realizadas a nivel de campo. El método de células del mesófilo, a nivel *in vitro*, utilizando fracción cruda de *M. fijiensis* sobre cultivares de plátano con diferentes niveles de resistencia, permite realizar pruebas de patogenicidad de manera rápida (72 horas), pero requiere de ajustes dirigidos a mejorar la concentración del agente selector.

6.2. Recomendaciones

1. Continuar con la utilización del método estándar, como un sistema eficiente para la evaluación temprana de resistencia a *M. fijiensis* en pruebas de patogenicidad.
2. Mantener en el método estándar las lecturas: número de conidios germinados, número de estomas penetrados y células de guarda necrosadas y hacer seguimiento al desarrollo de síntomas hasta no menos de 45 días con la escala de Fouré (1985).
3. Continuar con las investigaciones sobre métodos de selección temprana de resistencia a nivel *in vitro*, mejorando el protocolo de extracción, agilizando el proceso, con la utilización de FcMf en estado líquido ó un rango más amplio y alto de concentraciones del agente selector.
4. Incluir en los métodos de selección temprana de resistencia, cultivares con resistencia parcial, para obtener un gradiente de resistencia más amplio en terminos de respuesta en la evolución de los síntomas o a nivel de organización celular (células del mesófilo).
5. En siguientes trabajos de investigación, considerar incluir un número más amplio de cepas de *M. fijiensis*, ya que podrían tener diferentes tipos de metabolitos secundarios o micotoxinas, las cuales podrían ser excelentes selectores de resistencia.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadie, C; El Hadrami, A; Fouré, E and Carlier, J. 2002 Efficiency and durability of partial resistance against black leaf streak disease. In Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. 161-168p.
- Agrawal, A; Tuzun, S. and Brent, E. (ed.). 1999. Induced plant defenses against pathogens and herbivores. AMER. Phytopathology 87: 720-729p.
- Alvarado, Y; Leiva Mora, M; Rodríguez, D; Acosta, M; Cruz, N; Gómez Kosky, R; García, L; Bermúdez, I. and Padrón, J. 2002. Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. In: Proceedings of the 2 International Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. 169-175p.
- Arcioni, S; Pezzatti, M and Damiani, F. 1987. *In vitro* selection of alfalfa plants resistant to *Fusarium oxysporum* f.sp. . Theor Appl. Genet. 74:700-705 p.
- Belalcázar, S. 2000. Reacción de variedades mejoradas al ataque de Sigatoka negra. CIL (IDRC) INIBAP-Inpofos (eds) Produmedios. 192-214p.
- Beveraggi, A; Mourichon, X; Salle, G. 1995. Etude comparée des premières étapes de l'infection chez les bananiers sensibles et résistants infectés par le *Cercospora fijiensis* agent responsable de la maladie des racines noires. Canadian Journal of Botany. 73. p.1328-1337.
- Beveraggi, A. 1992. Etude des interactions hôte-parasite chez des bananiers sensibles et résistance inoculés par *Cercospora fijiensis* responsable de la maladie des racines noires. Université Montpellier II. 74p.
- Binaravá, P; Nedelnik, S; Fellner, M.T. & Nedbáková. 1990. Selection for resistance to filtrates of *Fusarium oxysporum* spp. In embryogenic cell suspension culture of medicao. Plant Cell. Tissue and Organ Cult. 22: 191-196p.
- Brettell, I.R ; Thomas, E ; Ignam, D.S. 1998. Revision of Texas mali-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile T-toxin resistant plants. Theor Appl, Genet 58: 55-58p.
- Burgeff, C. 1991. Etude des relations hôte-parasite dans les cas de la Cercosporiose noire du bananier causée par *Mycosphaerella fijiensis*. Activités chitinase et β -1,3-glucanase. Travail de fin d'études du gradé d'Ingénieur Agronome. Faculté de Sciences Agronomiques de Gembloux, Laboratoire de Pathologie Végétale. Gembloux, Belgique.

- Busogoro, J; Etame, J; Lognay, G; Van Cutsem, P and Lepoivre, P. 1999. Selection for banana resistance to black leaf streak disease. *Promusa*. Vol.8 No.2. 68p.
- Campanioni, B; Arzola, M; Rodriquéz, Y; Mosqueda, M; Pérez, M; Borrás, O; Lorenzo, J.C. y Santos, R. 2003. Use of culture-derived *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, race 1 filtrates for rapid and non-destructive *in vitro* differentiation between resistant and susceptible clones of field-growbanana. *Euphytica* 130 (3) 341-347p.
- Carballo, M and López, MA. 1994. Evaluación de *Beauveria bassiana* para el control biológico de *Cosmopolites sordidus* y *Metamasius hemipterus* en condiciones de campo. *MIP* 31: 22-34p.
- Carlier, J; Leburn, M.H; Zapater, M.F. Dubois, C; mourichon, X. 1996. genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*. V 5 p. 499-510.
- Carlier, J; Zapater, MF. Lapeyre, F; Jones, DR and Mourichon, X. 2000. Septoria leaf spot Disease of banana: a newly discovered disease caused by *Mycosphaerella emusae* (anamorph *Septoria emusae*). *Phytopathology* 90 (8): 884-890 p.
- Carreel, F. 1995. Etude de la diversité génétique des bananiers (genere *Musa*) a' l'aide des marqueurs RFLP. Thèse, INRA, on Paris France.
- Carlson, PS. 1973. Methionine sulphoximine-resistance mutants of tabaco. *Science* 180:1366-13668.
- Caruana, ML. 1999. Banana bunchy top virus the most serious virus disease of banana *Australasian Plant Pathology* 71p.
- Colmenares, MA; Gimenez, CA and Quintero, E. 2002. In Vitro Studies of *Mycosphaerella fijiensis* toxins on mesophyll cells viability. Congreso 2002 sobre biología in vitro. Vol. 38. Maracaibo, Venezuela. Enero-2002.
- Crous, P.W and Mourichon. 2002. *Mycosphaerella emusae* and its anamorph *Pseudoscopora emusae* spp. Nov. Causal agent of *emusae* leaf spot disease. *Sydonia*. 54 (1): 35-43.
- Chawla, H.S. and Wenzel, G. 1987. *In vitro* selection of barley and wheat for resistance against. *Helminthosporium sativum*. *Theor. Appl. Genet.* 74: 841-845p.
- Daub, E.M. 1982. Cercosporin, a Photosensitizing Toxin from *Cercospora* species. *Phytopathology*. 72: 370-374p.
- _____ 1986. Tissue Culture and the Selection of Resistance to Pathogens. *Ann. Rev. Phytopathology*. 24: 159-186p.

- De Wit, PJGM. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: A key role for recognition. *Trends in Plant Science* 2: 452-458.
- El Hadrami, A. 2000. Caractérisation de la résistance partielle des bananiers á la maladie des raices noires et évaluation de la variabilité de L'agent causal, *Mycosphaerella fijiensis*. Thèse d' Université. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Belgique. 13p.
- FAO. 2002. Base de datos estadísticos. Consultado el 21 de Septiembre de 2003. disponible en <http://www.fao.org.com>
- FHIA. 2002. 15 años de Generación y transferencia de Tecnología Agrícola. Informe anual. Septiembre 2000. Honduras. 29p.
- Fouré, E. 1985. Black leaf streak disease of Banana and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the disease in Gabon IRFA Paris.
- Fouré, E; Moreua, A. 1992. Contribution á L' étude épidémiologique de la cercosporiose noire dans la zone bananière du Mounjo au Cameroun de 1987 á 1989. *Fruits* 1: 3-16p.
- Frossard, P. 1980. Apparition d'une nouvelle et grave maladie foliaire des bananiers et plantains au Gabon: la maladie des raices noires, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Fruits* 35 :443-453.
- Fullerton, RA . 1990. Studies on *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in the Pacific Islands. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana INIBAP:Montpellier, 29-37p.
- Gold, C; Pena, J and Kamura. 2003. Biology and Integrated Pest Management for the Banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). *Integrated Pest Management Reviews*. 6: 79:155.
- González, R; Bustamante, E; Shannon, P; Okumoto, S and Leandro, G. 1996. Evaluación de Microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en Banano. *Manejo Integrado de Plagas*. 40: 12-16.
- González, M. 1999. Metodología para la manipulación y cultivo *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*. *Manejo integrado de plagas*. N° 53, Hoja técnica N° 30. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Gómez, K.R. 1996. Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*Ustilago scitaminea* Syd) a la caña de azúcar. Tesis de Doctorado. Universidad Central de las Villas. 95p.
- _____ 1998. Selección *in vitro* a enfermedades en : Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. (ed) Perez Ponce, JM. Ed. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, La Habana Cuba. 327-353p.

- Guzmán, M ; Romero, R 1997. Comparación de los funguicidas azoxistrobina propiconazole y difeconazole en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Banano (Musa AAA). Corbana, Costa Rica. 22 (47): 49-59p.
- Guzmán, M. 2002. Situación de la Sigatoka Negra en Costa Rica y opciones para el manejo de la enfermedad. Memorias ACORBAT. Cartagena de Indias, Colombia. 27 de Octubre-2 de Noviembre. 18-191 p.
- Hernández, R. 1995. Selección in vitro e invernadero de clones de Musa sp. Para la evaluación de su resistencia a la Sigatoka negra. Tesis.Msc. CATIE. Turrealba, Costa Rica.68-72p.
- Keen, N.T. 1990. Gene-for-gene complementary in plant-pathogen interactions, Annual Review. Genetics 24, 447p.
- Lockhart, BE & Jones, DR. 2002. Bacilliform virus related serologically to banana streak virus. Plant Disease 72, 230-233.
- Marin,D; Romero,R; Guzmán,M; Sutton, T. 2003. Black Sigatoka and increasing threat to banana cultivation.plant disease V. 87. No. 3
- Martínez,G; Pargas, R; Muñoz, D. 1999.La Sigatoka negra y su avance en el territorio Venezolano. Implicaciones Socioeconómicas. CENIAP.
- Mcdonald, BA. 1997. The population genetics of fungi : tools and techniques. Phytopathology 87: 448-453.
- Mehta, Y.R. and Brogin, R.L. 2000. Phytotoxicity of a culture filtrate produced by *Stemphylium solani* of cotton. Plant Disease. Vol. 84, No. 8 – 838-842p.
- Merchán V, VM. 1998. Manejo de problemas fitosanitarios del cultivo del plátano en la zona central cafetera. Seminario internacional sobre la producción de plátano,Armenia, Colombia. 177-191p.
- Moulion-Perfoura, A. 1999. First observation of the breakdown of high resistance in Yangambi Km5 (*Musa* sp.)to the black leaf streak disease in cameroon. Plant Disease. 83:78p.
- Mourichon, X et Fullerton, RA. 1990. Geographical distribution of two species *Mycosphaerella musicola* Leach. (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease and Black Leaf Streak Disease in bananas and plantains. Fruits: 45: 213- 18p.
- Mourichon, X. et Zapater, M. F. 1990. Obtention in vitro du stade *Mycosphaerella fijiensis*, forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. Fruits 45 (6): 553 – 557p.

- Mourichon, X; Lepoivre, P and Carlier, j. 2000. Host-pathogens interactions. Chapter 2. fungal disease of follaje. In diseases of banana. 67-72p.
- Mourichon, X et Fullerton, RA. 2002. Geographical distribution of two species *Mycosphaerella musicola* Leanch (*Cercospora musae*) and *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (*Cercospora fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease and BlackLeaf Streak Disease in bananas and plantains. Fruits 45: 213-218.
- Mulder, J.L; Holliday, P. 1974. *Mycosphaerella fijiensis*. CMI. Descriptions of Pathogenic Fungi and bacteria. No. 413.
- Okole, B and Shilz, F.A. 1997. Selection of *Mycosphaerella fijiensis* resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain. Plant Cell Reports. 16:339-343p.
- Ortiz, J; Gómez, M; Vásquez, N; Aguilar, M. 2002. Transformación Génética de Banano (cv. Gran Enano) y Plátano (cv Curaré) para introducir resistencia a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Memorias ACORBAT. Cartagena de Indias, Colombia 27 de octubre-2 de Noviembre. 9-53 p.
- Patiño, L.F. 2001. Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre Sigatoka negra en banano. Tesis Mag. MSc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 91p.
- Ploetz, RC et Mourichon. 1999. First report of Black Sigatoka in Florida. Plant Disease 83:300p.
- Ploetz, RC. 1993. Fusarium Wilt (Panama disease). Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pest. International network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France: CIRAD and collaboration with INIBAP. 149-158p.
- Pocasangre, LE. 2002. Mejoramiento biológico de vitroplantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador (*Radophulus similis*). 33-39 pp. En: memorias taller internacional de inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas Riveros AS y Pocasangre, LE. Eds. 27-30, Agosto. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Reamaekers, R. 1975. Black leaf spot disease in Zambia. PANS 21:396-400p.
- Reichel, H; Belalcázar, S; Múnera, G; Perez, R and Avévalo, E. 1997. The presence of banana streak virus infecting sugarcane and has been confined in plantain (musa AAB commonds) Sugar cane (*Sacharum officinarum*) and odible canna (*cannaedrelis*) in Colombia. INFOMUSA. 6 (1), 9-12.

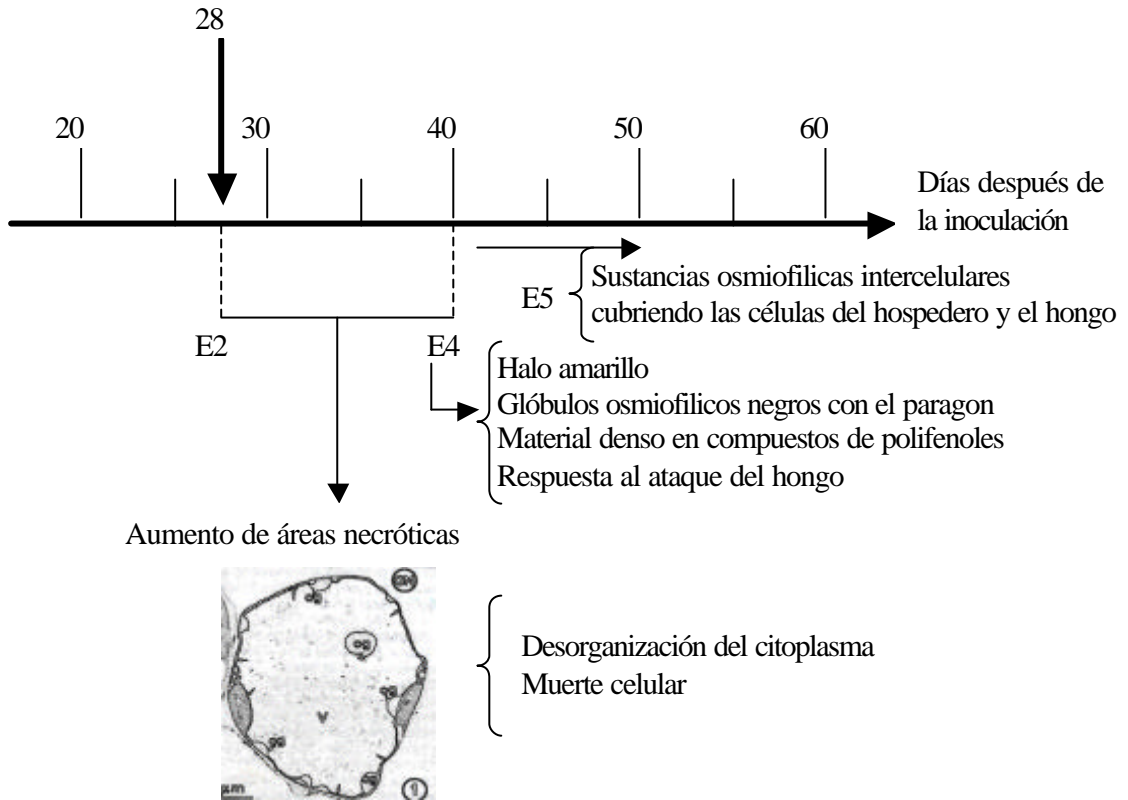
- Rivas,G; Zapater, MF; Carlier, J. 2002. Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* en el trópico Americano. XV reunión acorbat. Cartagena, Colombia. oct.28-01 nov. 173-174p.
- Rivas P, G.G. 2003. Effets de fondation et differentiation genetique aux échelles continentale et locale chez *Mycosphaerella fijiensis*, champignon responsable de la maladie des raies noires du bananier. Thesis Dr. Ecole Nationale Superiure Agronomique. Montpellier, France. 123p
- Riveros, AS.1995. Etude D eliciteurs asocies a la resistance du cultivar de bananier Yangambi Km.5 a *mycosphaerella fijiensis morelet*. Faculté de Sciences Agronomiques de Gembloux. 170p.
- Riveros, AS; Lepoivre. 1998. Inductores exógenos asociados con los mecanismos de defensa a la Sigatoka negra del banano. En: Memorias Simposio Internacional sobre Sigatoka negra del Banano, Manzanillo, Colima, México, 126-132p.
- Riveros, AS; Geraldo, I; Gamboa, A. 2002. Microbiological Control of Black Leaf streak Disease. *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases of Bananas: present Status and outlook. Proceedings of the 2 International Workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. 287-296p.
- Riveros, AS. 2002. Método para optimizar la obtención de proteína total e intercelular a partir de tejido foliar de *Musáceas*. En: Rosales FE y LE Pocasangre (eds) oferta tecnológica de banano y plátano para America Latina y el Caribe Turrialba; Costa Rica. 9-11p.
- Riveros, AS. 2002. Preparación de inductores exógenos a partir de suspensión conidial de *Mycosphaerella fijiensis* en germinación. En: Rosales FE y LE Pocasangre (eds) oferta tecnológica de banano y plátano para America Latina y el Caribe Turrialba; Costa Rica. 12-13p.
- Riveros, AS; Acuña, P . 2002. Obtención rápida y eficiente de células del mesófilo a partir de tejido foliar de *Musáceas*. En: Rosales FE y LE Pocasangre (eds) oferta tecnológica de banano y plátano para America Latina y el Caribe Turrialba; Costa Rica. 14-16 p.
- Rhodes, PL. 1964. A new banana disease in Fidji. Commonw. Phytopathol. News 10:38- 41p.
- Rodríguez, J y Rodríguez, A. 2003. Plan estrategico de plátano. Informe INIBAP-LAC.18p.
- Rosales, F; Pocasangre,L. 2002. Mejoramiento Convencional de Banano y Plátano: estrategias y logros. Acorbat. Cartagena, Colombia.

- Rosales, F; Belalcázar, S and Riveros, AS. 2002. plantain production in Latin America: A new profitable and sustainable technology. Global conference on bana and plantain. 28 de septiembre- 21 de Octubre. Bangalore India. 37p.
- Rotino, G.I; Falovina, A; Restaino, F. 1987. *In vitro* selection of eggplant cells resistant culture filtrate of *Verticillium dahliae* Kob. And regeneration of plants. Capsicum Newsletters. 6: 94-95p.
- Rowe, P.R. and Richardson, D.L. 1975. Breeding banana for disease resistance fruit quality. Bulletin No. 2 – December 1975. Tropical Agriculture Research Services. La Lima, Honduras. 39p.
- Sallé, G; Pichard, V; Mourichon, X. 1989. Cytological study of the interaction between *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and three cultivars of *Musa* presenting different levels of resistance. In INIBAP Workshop of Sigatoka Leaf Spots Diseases (*Mycosphaerella spp.*), San José, Costa Rica. 88p.
- Simmonds, N.W. 1962. The evolution of the bananas. Longman, London. 14: 198-212p.
- Stover, RH. 1987. Producción de plátano en presencia de Sigatoka negra. In: Pinochet, J. Plagas y Enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la zona centroamericana. Informe Técnico No. 10. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza, CATIE. Panamá. 27-36 p.
- Stover, R and Simmonds, N. 1987. Bananas. Longman scientific and technical. Third edition. England. 467p.
- Soto, M. 1992. Bananos, cultivo y comercialización. San José, Costa Rica. 674 p.
- Tapia, A.C; Vásquez, N; Galindo, JJ. 1998. Estudios sobre el proceso de infección, métodos de inoculación e identificación de la resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* en *Musa spp.* CATIE. Reunión de revisión interna. Turrialba, Costa Rica. 18-19p.
- Tejerina, JC. 1998. First report of Black Sigatoka in Bolivia. Plant Dis. 81 (11): 1332

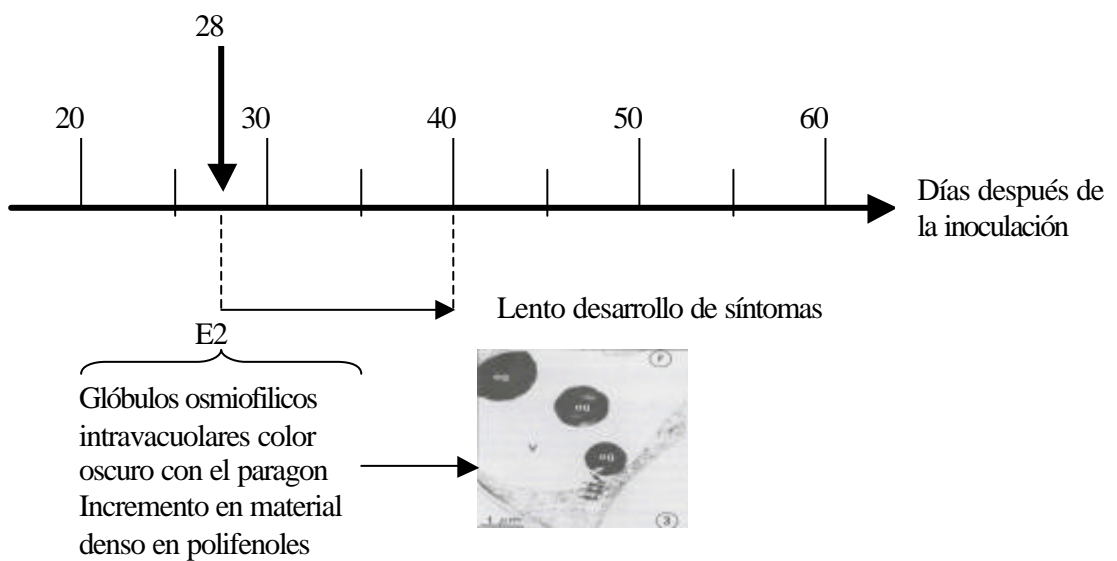
8. ANEXOS

Anexo 1. Estudios citológicos de la interacción entre *M. fijiensis* y tres cultivares de musa con diferentes niveles de resistencia (Fotos de microscopia tomadas de Sallé et al. 1989).

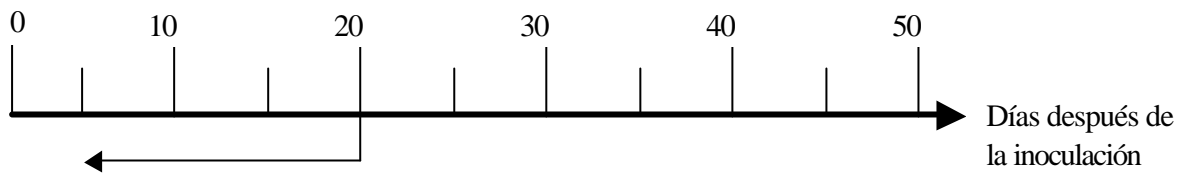
Gran Enano (S)-*M.fijiensis*



Fougamou (PR)-*M.fijiensis*



Yangambi Km 5 (R)-*M.fijiensis*



E2



1. Células necróticas inician y frenan los síntomas muy temprano (E2). No hay halo amarillo
2. No se detectan glóbulos osmiofilicos a depósitos de polifenol.
3. Quizás el hongo muere antes de los 20 días, no hay desarrollo de hifas en el interior del tejido hipodérmico.

Anexo 2. Características de los cultivares FHIA-21 (R) y Curraré (S) a la Sigatoka negra.

Morfología : Altura entre 3.5 y 4.0 metros; hojas decumbentes y un tallo brillante. El racimo ligeramente inclinado y asimétrico. Frutos de color verde, son rectos hacia la punta, la cual presenta una forma ligeramente puntiaguda.

Fenología: El tiempo desde la siembra hasta la floración de 240 a 280 días en el primer ciclo.

Cruce: AVP-67 - SH-3142

Producción: El peso neto del racimo es de 22 y 27 Kilos, con un número de dedos por racimo de 120 a 150. Se recomienda el desmane para asegurar el desarrollo adecuado de estos, en este caso el número de dedos es de 70 a 80.

Características de resistencia: El híbrido es resistente a la Sigatoka negra y Mal de Panamá, pero susceptible a los dos nematodos de mayor importancia: *Radophulus similis* y *Pratylenchus coffeae*.

Requerimientos Agronómicos: Las plantas toleran condiciones no óptimas de cultivo, pero conviene seleccionar suelos no inundables, bien drenados y que sean accesibles todo el año (FHIA. Informe anual 2000).

Características del cultivar Curraré

Morfología : Altura entre 3.5 y .4.0 metros, pseudotallo color rojo violáceo y hojas rayadas. El racimo grueso y los frutos presentan forma de “cuerno”.

Fenología: El tiempo desde la siembra hasta la floración es de 231 días en el primer ciclo.

Producción: El peso promedio del racimo es de 13.6 Kilos, con un número 36 dedos por racimo.

Características de resistencia: El híbrido es susceptible a la Sigatoka negra, Mal de Panamá y a los dos nematodos de mayor importancia: *Radophulus similis* y *Pratylenchus coffeae*.

Requerimientos Agronómicos: Las plantas se adaptan bien a condiciones tropicales con alta precipitación (Soto 1992).

Anexo 3. Medios utilizados para la extracción de las células del mesófilo

M1: Fragmentación	para 100 ml
Tampón MES (5mM)	0.10 gr
β-mercaptoetanol (se aplica al momento de usar)	1.00 gr
Ajustar el pH= 5.8	0.08 gr
M2: Infiltración-Digestión	para 100 ml
Tampón MES (5mM)	0.10 gr.
PVP K30	1.00 gr.
Macerase Pectinase	1.00gr.
K ₂ SO ₄ (12.5 mM)	1.00 gr.
β -Mercaptoetanol (se aplica al momento de usar)	0.20 gr.
Ajustar pH=5.8	0.08 gr.
M3: Digestión Enzimatica	para 100ml
Tampón MES(5mM)	0.10 gr.
PVP15	1.00 gr.
Macerase Pectinase (se aplica al momento de usar)	2.00 gr.
K ₂ SO ₄ (12.5 mM) (se aplica al momento de usar)	0.2 gr.
Sorbitol	5.50 gr.
β -Mercaptoetanol (se aplica al momento de usar)	0.08 gr.
Ajustar el pH= 5.8	
M4: Liberación de células	para 100 ml
Tampón Tris HCL (50mM)	0.606 gr
KNO ₃ (5mM)	0.050 gr
Sorbitol (0.3 mM)	5.466 gr
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0.047 gr
MgCL ₂ 6H ₂ O	0.020 gr
Agregar BAP(0.001 gr.)en 1cc de KOH 1N	Se aplica posterior a la preparación del medio y ajuste del pH
Ajustar pH=7.8	

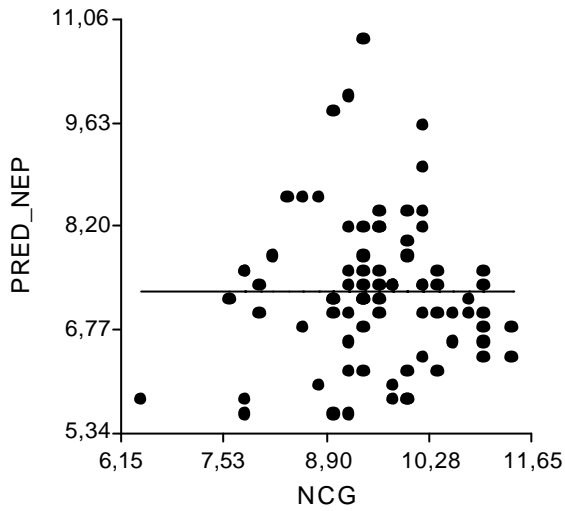
Anexo 4: Número de estomas de los cultivares de plátano FHIA-21 (R) y Curraré (S).
Lecturas con objetivo 10X.

Cultivar	Campo microscópico					
Curraré	C1	C2	C3	C4	C5	Total
D1	300	300	327	336	400	1,663
D2	355	340	318	342	338	1,693
D3	322	375	325	332	340	1,699
D4	300	300	316	328	337	1,581
Total						6,636
FHIA-21						
D1	214	244	265	262	279	1,529
D2	236	280	265	245	210	1,236
D3	282	275	260	218	248	1,283
D4	255	283	275	223	251	1,287
Total						5,335

Anexo 5. Promedios de número de conidios germinados en los cultivares FHIA-21 y Curaré, a los 11 días de evaluación

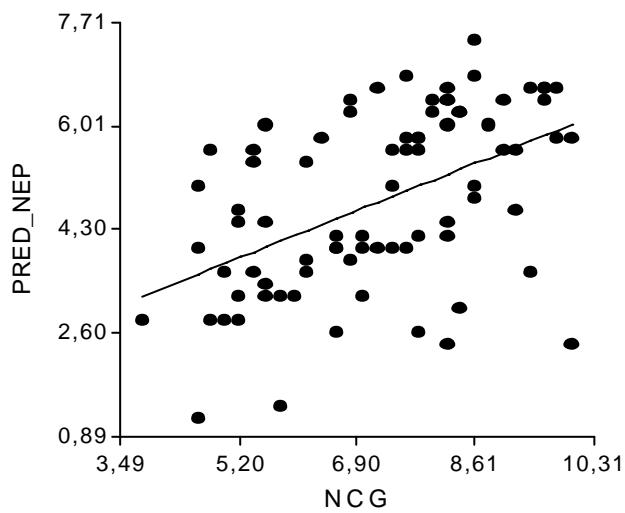
Variedad	Cepas									
	Fortuna	Peralta	Matina	Muelle	Sta Clara	Montaña	Expaca	Sixaola	Estrella	Sapiquí
FHIA-21	7.5	8.68	5.45	6.5	7.48	6.625	7.875	7.45	6.15	8.6
des st	1.81	1.05	1.16	1.51	1.48	1.2	0.97	1.42	0.87	1.2
Curaré	9.35	10.425	9.5	9.4	10.175	10.15	9.575	10.05	8.675	8.6
des st	0.98	0.80	1.02	0.51	0.58	0.75	0.57	0.50	0.87	1.20

Anexo 6. Regresión lineal entre el número de estomas penetrados (NEP) y número de conidios germinados (NCG) para los cultivares de plátano FHIA-21 y Curraré



$Y = a + bx; R^2 = 6.7$

Curraré



FHIA-21

$Y = a + bx; R^2 = 0.25$

Anexo 7. Evaluación de resistencia *in vitro* en diferentes cultivos

Cultivo	Patógeno	Agente selectivo	Material biológico	Respuesta observada	Referencia
Alfalfa	<i>Fusarium oxysporum</i>	Filtrado de cultivo	Callos y suspensiones celulares embriogénicas	Aumento resistencia	Arcioni <i>et al</i> 1987; Binarová <i>et al.</i> 1990
Algodón	<i>Stemphylium solani</i>	Filtrado de cultivo	Raíz	Aumento resistencia	Mehta and Brogin 2000
Avena	<i>Hemilthosporium victoriae</i>	Toxina victorin	Callos	Aumento resistencia	Rines y Luke 1985
Banano	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Toxina purificada Juglone	Cloroplastos Células del mésofilo	diferenciación de niveles de resistencia	Busogoro <i>et al.</i> 1999
	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Filtrado de cultivo Filtrado de cultivo	Células mésofilo Callos	“Screening” resistencia “Screening” resistencia	Colmenares <i>et al.</i> 2002 Hernandez 1995
Berenjena	<i>Verticillium dahliae</i>	Filtrado de cultivo	Callos	Aumento de la resistencia	Rotino <i>et al.</i> 1987
Caña de azúcar	<i>Ustilago scitaminea</i>	Toxina purificada	Callos suspensiones celulares	“Screening” resistencia	Gómez 1998, 1996
Cebada	<i>Helminthosporium sativum</i>	Toxina purificada	Callos	Resistencia	Chawla y Wenzel 1987 b; Chawla y Kole 1990
Maíz	<i>Hemilthosporium maydis</i>	Toxina HmT	Callos	Aumento resistencia	Brettell <i>et al.</i> 1980

Anexo 8. ANOVA para las variables número de conidios germinados (NCG), número de estomas penetrados (NEP) y células de guarda necrosadas (CGN)

Metódo	Interacción	Variable	CME	Valor p
Estandar (10 cepas)	Cepa-cultivar-planta	NCG	0.798	>0.01
	cultivares		5.10	< 0.0099
	Cepa-cultivar	NEP	0.55	>0.01
	cultivares		2.12	< 0.0001
	Cepa-cultivar	CGN	3.72	< 0.0001
Estandar (1 cepa)	cultivares	NCG	0.79	>0.01
	cultivares	NEP	0.46	>0.01
	cultivares	CGN	2.23	< 0.0001
	CNG-días		2.16	< 0.0009
Cél. mesófilo	Cultivares/trat	%viab. cm	3.25	< 0.0001
	tratamientos		2.30	< 0.0001
	Cultivares/trat	%viab. cdef.	4.23	< 0.0001
	tratamientos		3.06	< 0.0001

