

Thesis  
J61ec  
c.2

**AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA  
DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION  
ESCUELA DE POSGRADUADOS**

**ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE  
CEPAS DEL HONGO *Mycosphaerella fijensis* MORELET. EN NITRÓGENO LÍQUIDO  
(-196 °C)**

**POR**

**JUAN R. JIMÉNEZ ROJAS**

**CATIE**

Turrialba, Costa Rica  
2001

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE  
CEPAS DEL HONGO *Mycosphaerella fijiensis* MORELET. EN NITRÓGENO  
LÍQUIDO (-196 °C).

POR

JUAN R. JIMÉNEZ ROJAS

**CATIE**

Turrialba, Costa Rica  
2001

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE ENSEÑANZA  
ÁREA DE POSGRADO**

**ESTABLECIMIENTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CRIOCONSERVACIÓN  
DE CEPAS DEL HONGO *Mycosphaerella fijiensis* MORELET. EN NITRÓGENO  
LÍQUIDO (-196 °C).**

**Esta tesis fue aceptada en su presente forma por la Escuela de Posgraduados,  
el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y aprobada por  
el Comité Consejero del estudiante, como requisito parcial para optar por el  
grado de**

***Magister Scientiae***

**Por**

**JUAN ROBERTO JIMÉNEZ ROJAS**

**CATIE**

**Turrialba, Costa Rica**

**2001**

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

FIRMANTES:

---

María Elena Aguilar/Ph.D.  
**Consejero Principal**

---

Nelly Vásquez, M.Sc.  
**Miembro Comité Consejero**

---

Wilbert Phillips, M.Sc.  
**Miembro Comité Consejero**

---

Ali Moslemi, Ph.D.  
**Director Escuela de Posgrado**

---

Juan Roberto Jiménez Rojas .  
**Candidato**

## DEDICATORIA

A Dios por enseñarme lo maravilloso que es vivir.

A mis padres y hermanos quienes me brindaron siempre todo su apoyo.

## AGRADECIMIENTO

Especial agradecimiento a María Elena Aguilar Ph. D. y Nelly Vásquez M. Sc. por su amistad, apoyo incondicional y orientación de este trabajo.

A Wilberth Phillips M. Sc. por el tiempo dedicado a la revisión de este documento.

A Gilberto Paez Ph. D. por su apoyo en la cosecución de la beca que me permitió sufragar los gastos académicos de mi carrera.

A Edgar Esquivel, Karol Salazar, Guillermo Hidalgo, Maritza Loaiza y Manrique González por su amistad y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros José Robledo, Fredy Rosales, Julián Pérez, Juan L. Ortiz y Jeannette Cárdenas por su afecto, consejos y apoyo en todo momento, aún en los más difíciles.

A Jorge Cruz B. y Miguel Altamirano por su amistad y buenos deseos.

A Alex López y Heillen Monge por soportarme durante todo este tiempo.

A Noilly Navarro y Eduardo Molina por sus esfuerzos para apoyar mi permanencia en CATIE.

A la Corporación Bananera Nacional y Galileo Rivas M. Sc. por facilitar el patógeno para le ejecución de esta investigación.

## CONTENIDO

RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	x
1. INTRODUCCION	1
1.1 Objetivo general	2
1.1.2 Objetivos específicos:	3
1.3 Hipótesis:	3
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos generales de la enfermedad	4
2.1.1 Origen y distribución	4
2.1.2 Clasificación taxonómica	4
2.2 Sintomatología	5
2.3 Ciclo biológico del patógeno	5
2.4 Epidemiología	8
2.6 Conservación de hongos fitopatógenos	8
2.6.2 Crioconservación de hongos fitopatógenos	11
3. MATERIALES Y METODOS	15
3.1. Localización de la investigación	15
3.2 Material experimental	15
3.2.1 Material vegetal	15
3.3 Cepas del patógeno	16
3.4 Metodología	17
3.4.1 Preparación del medio para cultivo	17
3.4.2 Preparación del medio para crioconservación (MCC)	17
3.4.3 Multiplicación de las cepas	17
3.4.4 Tratamientos evaluados	18
3.4.5 Recuperación de las cepas criocongeladas	18
3.4.6 Evaluación de la producción de conidios de las cepas criocongeladas y estandarización de inóculo	18
3.4.7 Evaluación de patogenicidad de las cepas criocongeladas	19
3.4.8 Medición de las condiciones meteorológicas	21
3.4.9 Variables evaluadas	21
3.5 Diseño experimental para evaluar la producción de conidios y la prueba de patogenicidad de las cepas criocongeladas	23

3.5.1 Análisis de los datos	23
3.4.9 Estudio histológico	24
4. RESULTADOS Y DISCUSION	25
4.1 Multiplicación de las cepas	25
4.2 Tratamientos de criocongelación	25
4.3 Recuperación y producción de conidios de las cepas criocongeladas	25
4.3.1 Recuperación de las cepas	25
4.3.2 Producción de conidios	30
4.4 Condiciones meteorológicos	33
4.5 Evaluación del desarrollo de la enfermedad	35
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
5.1 Conclusiones	39
5.2 Recomendaciones	40
6. LITERATURA CITADA	41
ANEXOS	46



**Jiménez R, JR.** 2001. Establecimiento de una metodología para la crioconservación del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. en nitrógeno líquido (-196 °C). Tesis Mag. Sci. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 60 p.

**Palabras claves:** crioconservación, nitrógeno líquido, *Mycosphaerella fijiensis*, inoculación, producción de conidios, patogenicidad.

## RESUMEN

La técnica de crioconservación por inmersión directa en nitrógeno líquido (-196 °C) se estableció para la conservación del hongo patógeno *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la Sigatoka Negra en banano y plátano, con fines de transferencia y fuente de material genético de buena calidad para trabajos de investigación fitopatológica. Con esta técnica se consigue detener la actividad metabólica celular, lo que protege la estabilidad genética de los organismos por tiempo indefinido, con mínimo mantenimiento y ahorro de espacio.

En esta investigación se incluyeron 10 cepas de *M. fijiensis* procedentes de la zona Atlántica de Costa Rica, las que fueron colocadas en un medio crioprotectante y criocongeladas por un periodo de dos horas en nitrógeno líquido. Se valoró la recuperación, producción de conidios y patogenicidad de cada una de las cepas por medio de la inoculación artificial en hojas de banano (Gran Enano).

El grado de recuperación de las cepas después de la criocongelación a -196 °C, medida en términos de la superficie del medio de cultivo cubierto por las colonias y el micelio del patógeno, mostró variaciones entre el 20 y 100%. La producción de conidios mostró valores arriba de 150 000 conidios por mililitro en el 90% de las cepas y la patogenicidad, medida por medio de cuatro periodos (PI= Periodo de Incubación, PT= Periodo de Transición, PL= Periodo de Latencia y NT= Necrosis Total), se mantuvo para todas las cepas.

**Jiménez R, JR.** 2001. Methodology establishment for *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. crioconservation in liquid nitrogen (-196 °C). Thesis M. Sc. CATIE, Turrialba, CR. 60 p.

**Key words:** crioconservation, liquid nitrogen, *Mycosphaerella fijiensis*, inoculation, conidia production, patogenicidad.

## SUMMARY

The deep freeze in liquid nitrogen (-196 °C) crioconservation technique for *Mycosphaerella fijiensis* by direct immersion was settled down for pathogen conserving, transferring purpose and good quality genetic material for research. This technique allow to stop the cellular metabolic activity, which protects the genetic stability of organisms for indefinite period, with minimum maintenance and space.

In this investigation 10 *M. fijiensis* strains were included coming from the Atlantic area of Costa Rica, those that placed in a crioprotectant medium and deep freeze in liquid nitrogen during two hours. It was valued the recovery, conidios production and patogenicity of each strins through artificial inoculation in banana leaves (Gran Enano).

The strains recovery degree after deep freeze to -196 °C, measure in terms of medium surface covered by colonies and micelium grow of pathogen, showed variations between 20 and 100 %. The conidia production showed values up to 150 000 conidia per milliliter in 90% of strains and patogenicity, measure by means of four periods (PI = Incubation Period, PT = Transition Period, PL = Latency Period and NT = Total Necrosis), was maintained for all strains.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Fig. 1. Ciclo biológico de <i>M. fijiensis</i> . Tomado de Fouré (1994).....	6
Fig. 2. Conidio típico de <i>M. fijiensis</i> visto a través del microscopio de luz.....	7
Fig. 3. Contaminación por ácaros en colonias de <i>M. fijiensis</i> creciendo activamente. Izquierda: colonia libre de ácaros. Derecha: colonia devorada por ácaros. Nótese el grado de deterioro sufrido.....	11
Fig. 4. Cámara usada para favorecer condiciones de alta humedad durante los cinco días posteriores a la inoculación de las plantas de banano con las cepas crioconservadas en nitrógeno líquido.....	20
Fig. 5. Lesiones en estado dos de infección en hojas de plantas jóvenes de banano (Gran Enano) inoculadas artificialmente con <i>M. fijiensis</i> . Nótese en el recuadro los pequeños bloques (agrupamiento) de manchas difusas de color café claro en la superficie abaxial de la hoja.....	22
Figura 6. Respuesta de 10 cepas de <i>M. fijiensis</i> , crecidas durante 15 días a 26 °C y 12/12 periodos de luz-oscuridad luego de ser crioconservadas (+NL) o no (-NL y Test.) en nitrógeno líquido.....	26
Fig. 7. Izquierda: deterioro del micelio observado en muestras congeladas en nitrógeno líquido (-196 °C). Nótese la aglomeración de micelio en algunos sectores. Derecha: patrón de distribución del micelio sano en muestras testigo.....	29
Fig. 8. Respuesta de la producción de conidios de 10 cepas de <i>M. fijiensis</i> , crecidas durante 15 días a 26 °C y periodos de 12 horas de luz-oscuridad luego ser crioconservadas (+NL) o no (-NL y Test.) en nitrógeno líquido.....	31
Fig. 9. Histología de estructuras (conidios y micelios) de <i>M. fijiensis</i> después de la congelación en NL. El conidio presenta una pared más gruesa (c) con mayor contenido de almidón (a) en comparación al micelio (m).....	32
Fig. 10. Gráfico de tendencia para la temperatura y la humedad relativa dentro de la cámara húmeda construida para la evaluación de la patogenicidad de las cepas de <i>M. fijiensis</i> .....	34
Fig. 11. Gráfico de tendencia para la temperatura y la humedad relativa en el invernadero donde se ubicaron las plantas para la evaluación de la patogenicidad.....	34

Fig. 12. Respuesta a la inoculación artificial de 10 cepas de *M. fijiensis* crioconservadas o no en hojas de banano (Gran Enano) evaluada por medio de 4 periodos (PI= periodo de incubación, PT= periodo de transición, PL= periodo de latencia, NT= necrosis total) .....36

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Principales métodos convencionales usados en la conservación de hongos .....	10
Cuadro 2. Lugar de procedencia de las cepas evaluadas.....	16
Cuadro 3. Valores promedio de recuperación (invasión) de las cepas de <i>M. fijiensis</i> sobre el medio de cultivo como respuesta al tratamiento de crioconservación.....	27

## LISTA DE ANEXOS

Anexo	Página
1.A Tabla de referencia para determinar la invasión sobre el medio de cultivo de las cepas en los diferentes tratamientos (Testigo, -NL,+NL).....	46
2.A Resultado del análisis estadístico para la esporulación de conidios.....	47
3.A Promedio de la esporulación conidial en las diferentes cepas de <i>M. fijiensis</i> sometidas a los tratamientos de crioconservación.....	48
4.A Promedio para los periodos de Incubación (PI), Transición (PT) y Latencia (PL) representados en días durante la evolución de la Sigatoka negra utilizando cepas sometidas a los tratamientos de crioconservación (Testigo, -NL, +NL)...	49
5.A Promedio para el periodo a Necrosis Total (NT) representado en días durante la evolución de la Sigatoka negra utilizando cepas sometidas a los tratamientos de crioconservación (Testigo, -NL, +NL).....	50
6.A Resultado del análisis estadístico (SAS) para el Periodo de Incubación (PI).....	51

7.A Resultado del análisis estadístico (SAS) para el Periodo de Transición (PT).....	52
8.A Resultado del análisis estadístico (SAS) para el Periodo de Latencia (PL).....	53
9.A Resultado del análisis estadístico (SAS) para el Periodo a Necrosis Total (NT)..	54

## 1. INTRODUCCION

El banano y el plátano se cultivan en 120 países, con una producción total aproximada de 75 millones de toneladas (casi el 32% de la producción total mundial de frutas). El 90% de esa producción constituye una fuente significativa de alimentos para más de 400 millones de personas que habitan en países tropicales, para quienes constituye un alimento básico, rico en carbohidratos; excelente fuente de vitamina C y minerales como calcio, potasio, fósforo y magnesio (Rodríguez et al. 1997; Stover y Simmonds 1987, Singh y Chadha 1996).

Sin embargo, en las dos últimas décadas la producción se ha visto seriamente amenazada por la presión de plagas (Rodríguez *et al.* 1994); dentro de las cuales los hongos que causan la Sigatoka Negra y la Sigatoka Amarilla, representan los patógenos más importantes en el cultivo (Daniels *et al.* 1995, Cordeiro *et al.* 1998).

Cuando no son controlados, estos patógenos pueden reducir severamente el tejido foliar fotosintético de la planta, lo que provoca una disminución en el rendimiento del cultivo hasta en un 90% (Fouré 1985), debido a que se acelera el proceso de maduración del fruto (Mobambo 1995; Pérez 1998).

Según Fullerton y Stover (1990), a la fecha, la base del control de la Sigatoka la han constituido los fungicidas sistémicos. Carlier *et al.* (1999), calcularon el costo del control con fungicidas entre \$400 y \$1 400 Ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. En Costa Rica, con un área de 52.737 hectáreas en producción en 1995 (Serrano y Marín 1998), el costo para el control de Sigatoka negra fue estimado en \$49 millones año<sup>-1</sup> (Romero y Sutton 1997).

Para Fouré (1994) y García *et al.* (1997) dos posibles formas de enfrentar el problema de la Sigatoka son a través del uso de plantas mejoradas genéticamente y la aplicación de controladores biológicos asociados con prácticas adecuadas, que de tener éxito, puede resultar más económico, estable y ecológicamente deseable que el control actual.

No obstante, uno de los problemas más frecuentes para los mejoradores en banano

es la falta de información respecto a la naturaleza del patógeno, esto determina la prioridad de poseer un inventario de las poblaciones del patógeno que puedan ser utilizadas en pruebas en investigación (Mourichon 1994).

Sin embargo, disponer de una colección de organismos patógenos con ayuda de los métodos actuales no es sencillo. Abdelnour (1996) y Tan *et al.* (1991) aseguran que la conservación de organismos patógenos por métodos tradicionales, como la refrigeración y el cultivo periódico, aumentan los riesgos de envejecimiento, contaminación y mutación debido a la manipulación a que son sometidos.

Chandler (1994) y Abdelnour-Esquivel y Escalant (1994) indican que el grupo de técnicas de crioconservación (nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se considera la vía más confiable para el almacenamiento a largo plazo con mínimo mantenimiento y ahorro de espacio.

Para el caso específico del presente trabajo se considera de vital importancia la conservación estable y duradera de aislamientos de *M. fijiensis* provenientes de diferentes localidades de la provincia de Limón y Alajuela de Costa Rica. Esto permitirá emplear el material genético en diferentes momentos o países.

Luego de una amplia revisión de literatura no se encontró información relacionada con el almacenamiento, de *M. fijiensis*, por medio de inmersión directa en nitrógeno líquido, por tal motivo, este trabajo podrá brindar los primeros resultados relacionados con este tema.

### **1.1 Objetivo general**

Establecer una metodología para la crioconservación de *M. fijiensis* por medio de inmersión directa en nitrógeno líquido que asegure su posterior recuperación.

### **1.1.2 Objetivos específicos:**

1. Establecer las condiciones físicas necesarias para la conservación a largo plazo (nitrógeno líquido) de diez cepas de *M. fijiensis* provenientes de la zona atlántica de Costa Rica.
2. Evaluar la supervivencia del hongo *M. fijiensis* al proceso de congelación mediante pruebas de patogenicidad, capacidad de esporulación de conidios y posibles daños celulares.

### **1.3 Hipótesis:**

- Es posible establecer una metodología para la conservación de *Mycosphaerella fijiensis* en nitrógeno líquido que permita su recuperación posterior y niveles adecuados de supervivencia y patogenicidad.



## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos generales de la enfermedad

#### 2.1.1 Origen y distribución

La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), se describió como enfermedad en 1963, en la Isla de Fiji (Rhodes 1964). En Centroamérica, se describió por primera vez en Honduras en 1972 y desde allí se diseminó por el resto de la región (Stover 1980). En Costa Rica fue identificada en 1979 (Marín y Romero 1992), posteriormente, fue registrada en Colombia en 1981, a continuación en Ecuador en 1989 y más recientemente en Cuba y Venezuela (Mourichon y Fullerton 1990) (Anexo 2 A).

#### 2.1.2 Clasificación taxonómica

La Sigatoka negra es una enfermedad foliar causada por el hongo Ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* (Belalcázar *et al.* 1998) en su estado sexual o teleomorfo, mientras que su estado asexual o anamorfo es denominado *Paracercospora fijiensis* Morelet (Deighton) (Fullerton y Stover 1990).

En un principio, se consideró que el agente causal de la Sigatoka Negra, descrito en Honduras, presentaba diferencias en el estado anamorfo con respecto a *Mycosphaerella fijiensis* explicado anteriormente en la región del Pacífico (Asiático). Debido a ello se determinó que el hongo encontrado en Honduras pertenecía a una variedad diferente y se designó como var. *difformis*. No obstante, luego de examinar un gran número de especímenes, la diferencia entre ambos organismos fue escasa, por lo que actualmente se considera *M. fijiensis* var *difformis* como sinónimo de *M. fijiensis* (Fullerton y Stover 1990).

## 2.2 Sintomatología

Tapia (1993) resume las observaciones recopiladas de una serie de autores que desde 1946 han trabajado en la descripción de la sintomatología de la enfermedad:

Estado 1: Pequeñas pizcas café rojizo, menores de 0.25 mm de longitud.

Estado 2: Las pizcas se alargan y se forman estrías café rojizo.

Estado 3: La estría se ensancha y alarga hasta alcanzar dimensiones alrededor de 20 y 30 mm.

Estado 4: La mancha se torna elíptica, rodeada en ocasiones de un halo clorótico.

Estado 5: La coloración negruzca es total con un halo clorótico alrededor.

Estado 6: El centro de la mancha se seca, la lesión es rodeada por un margen negro con halo clorótico

Las lesiones características de los estados 5 y 6, son vistas solamente cuando hay una pequeña cantidad de inóculo y las condiciones climáticas no son particularmente favorables para la rápida dispersión de la enfermedad (Fouré 1994).

## 2.3 Ciclo biológico del patógeno

El hongo *M. fijiensis* tiene la capacidad de reproducirse tanto por la vía sexual, mediante ascosporas, como por la vía asexual (Fig. 1) por medio de conidios (Stover, 1980).

Una vez que las esporas (ascosporas y conidios) se sitúan en la superficie de la hoja bajo condiciones meteorológicas adecuadas, germinan dos o tres horas después. El tubo germinativo penetra a través de los estomas después de 48 a 72 horas e inician un proceso rápido de colonización del mesófilo (Stover, 1980; Belalcázar y Merchán 1991, Fouré y Moureau 1992). A varios intervalos a lo largo de la hifa, se desarrollan pequeñas ramificaciones laterales que terminan como apresorios sobre el estoma (Meredith y Lawrence, 1969).

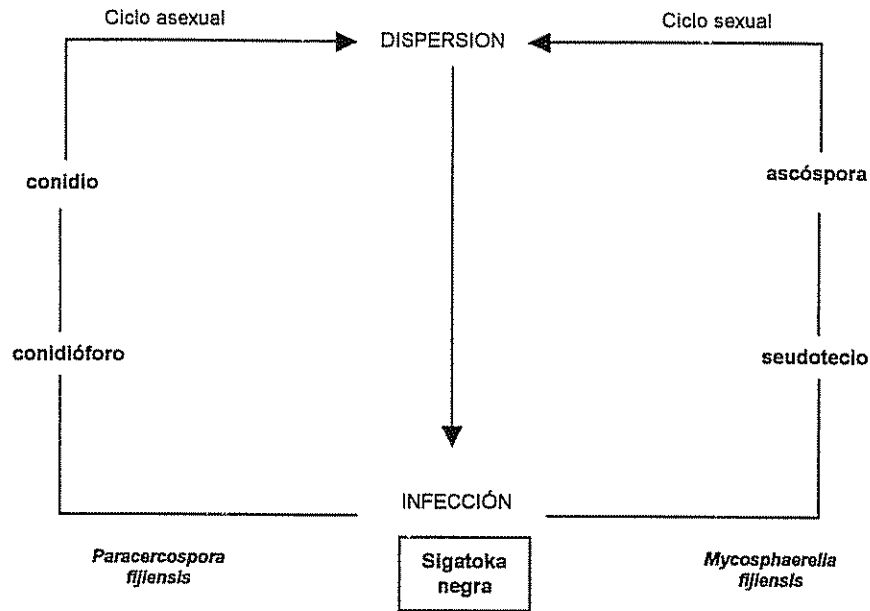


Fig. 1. Ciclo biológico de *M. fijiensis*. Tomado de Fouré (1994)

Cuando la infección se establece, una o más hifas vegetativas emergen desde el estoma desarrollándose los conidióforos individualmente o en grupos pequeños (Gauhl 1992). La mayoría son producidos en la superficie inferior (abaxial), sin embargo, una pequeña cantidad aparece en la superficie adaxial o superior (Carlier *et al.* 1999).

La formación de conidios en la cara abaxial de la hoja puede darse desde la aparición de la pizca, primer síntoma de la enfermedad, hasta la presencia de la mancha negra, estado avanzado de la enfermedad. Los conidios (Fig. 2) tienen forma obclavada (clavo invertido) a cilindroclavada, reduciendo en cono desde la base hasta al ápice; de curvos a medio curvos. El extremo distal es obtuso y el basal obcónicamente truncado con presencia de cicatriz basal o hilum, esta última característica lo distingue de *M. musicola* (Sigatoka amarilla). Poseen de uno a diez septos. Son hialinos, de color olivo a verde olivo (Stover 1980; Meredith y Lawrence 1969).



Fig. 2. Conidio típico de *M. fijiensis* visto a través del microscopio de luz.

Los cuerpos fructíferos de la fase sexual, espermogonios y peritecios, pueden comenzar a formarse en el envés de la hoja a partir de la formación de la mancha negra (estado 5); como producto del agrupamiento de hifas en la cámara subestomática (Meredith y Lawrence, 1969; Belalcazar y Merchán, 1991).

Transcurrido el periodo de maduración de los peritecios, fertilizados previamente por los espermacios, las ascósporas que se encuentran en sacos llamados ascas son liberadas a través del ostiolo (abertura superior de los peritecios) y transportadas por el viento (Mourichon y Fullerton, 1990).

Aunque se ha visto que todas las hojas son igualmente susceptibles a *M. fijiensis*, la mayor parte de la infección ocurre en las hojas nuevas, entre la emergencia y el desplegamiento de la hoja (Stover y Simmonds 1987).

## 2.4 Epidemiología

Fouré (1994); Fouré y Moreau (1992) encontraron variaciones sustanciales relacionadas con la alta precipitación y baja evaporación, y por lo tanto con alta humedad, sobre el ciclo de desarrollo de la Sigatoka Negra.

Otros elementos como temperatura y disponibilidad de inóculo son incluidos por Porras y Pérez (1997), dentro del grupo de factores que afectan el desarrollo de la enfermedad

En relación con la temperatura, Porras y Pérez (1997) comprobaron que la temperatura mínima, óptima y máxima para el crecimiento del tubo germinativo del hongo resultó ser 11, 27 y 38°C, respectivamente. A temperaturas inferiores a 20°C y ausencia o poco depósito de rocío y lluvia sobre las hojas, la velocidad de crecimiento de los tubos es 50% menor que la que se obtiene con una temperatura óptima.

Por otro lado, la cantidad de inóculo tiene una fuerte relación con la velocidad de desarrollo de la enfermedad, pues, una fuerte presión de inóculo (gran cantidad de ascosporas y conidios sobre la hoja) acelera la evolución de los síntomas y enmascara el efecto de condiciones climáticas relativamente desfavorables (Porras y Pérez 1997).

Respecto a la humedad relativa (HR) necesaria para la germinación de las estructuras reproductivas y el desarrollo del tubo germinativo, Jacome *et al.* (1991) indican que las ascosporas requieren de una película de agua libre sobre las hojas o un ambiente húmedo cercano a la saturación (98 – 100% HR), mientras que los conidios germinan en un rango mayor de humedad (92 – 100% HR).

## 2.6 Conservación de hongos fitopatógenos

Ingram (1998) sugiere tres aportes importantes de los hongos fitopatógenos al desarrollo de investigación y tecnología que hacen necesaria su conservación: 1) los hongos fitopatógenos coleccionados ofrecen información valiosa sobre su diversidad

genética y son útiles en las evaluaciones previas de resistencia, 2) representan materia prima para mucha de la investigación base sobre ciclos de vida y variación genética del patógeno, evolución y dinámica de poblaciones y 3) constituyen fuente de información para la ingeniería genética.

El principal objetivo de una colección de hongos patógenos es mantener las cepas o aislamientos en estado viable sin cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos hasta su uso futuro (Smith y Onions 1994). Por tal motivo, los métodos más usados para este tipo de conservación apuntan a la reducción del crecimiento y metabolismo de estos organismos.

La conservación en aceite mineral, suelo seco, silica gel, medio de cultivo con trasferencias frecuentes o agua destilada, es usada para periodos relativamente cortos. Sin embargo, estos métodos requieren mucho trabajo y tiempo; mientras que la crioconservación en nitrógeno líquido (-196 °C) representa un método rápido y seguro para la estabilidad genética de los organismos, para colecciones a largo plazo (Croan *et al.* 1999, Yang y Rossignol 1998).

La elección del método de conservación más apropiado para cada hongo dependerá de las características de cada individuo. En este sentido, Ellis (1979), Pereira *et al.*(1999), Burdsall y Dorworth (1994) determinaron que la conservación en agua destilada ofrece resultados satisfactorios para los hongos que ellos trabajaron. Smith y Onions (1983) encontraron que 47 de 58 especies de hongos patógenos permanecieron viables después de 32 años conservados en aceite mineral y otra cantidad, aunque menor, mostró buena recuperación después de 11 años conservados en silica gel.

Así mismo, Tooley (1998), Long *et al.*(1978), Croan *et al.*(1999), Yang y Rossinol (1998) y Stalpers *et al.*(1987), por mencionar algunos, encontraron buenos resultados en la recuperación de estructuras de hongos almacenados en nitrógeno líquido (NL), con o sin pretratamiento de congelación.

En el Cuadro 1, según Smith y Onion (1994), se muestran los principales métodos

convencionales para la conservación de hongos fitopatógenos, junto con sus ventajas y desventajas.

En el caso particular de *M. fijiensis*, la conservación mediante la técnica de subcultivos periódicos ha sido difícil debido al lento crecimiento que exhibe el hongo en platos de cultivo, ya que requiere de condiciones muy específicas para lograr esporulación de conidios (en laboratorio no se ha logrado observar producción de ascosporas) y tiende a agotarse después de dos a tres subcultivos. Además, los cultivos de *M. fijiensis*, al igual que la mayoría de cultivos de otros hongos, son muy susceptibles a ser infestados por ácaros (Figura 3) que los devoran o producen contaminación con bacterias que los destruyen<sup>1</sup>.

Cuadro 1. Principales métodos convencionales usados en la conservación de hongos

Método	Ventajas	Desventajas
1. Subcultivos periódicos	<b>Método simple.</b> Transferencia de porciones del hongo a medio fresco.	Posibilidad de: variación genética, pérdida de patogenicidad, contaminación.
2. Almacenamiento en aceite mineral	Algunos <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> viables hasta por 40 años.  Recomendado para laboratorios con <b>escaso recurso.</b>	Riesgo de: selección de individuos por crecimiento en condiciones adversas, lento crecimiento de materiales recuperados, contaminación.
3. Almacenamiento en agua estéril	<b>Método sencillo.</b> Trozos de agar con hongo en viales con agua estéril a 20 – 25 °C.	Se observa pérdida de patogenicidad aunque son capaces de infectar al hospedero.
4. Almacenamiento por desecación	<b>Técnica simple.</b> Hongo o esporas bajo deshidratación por aire seco o con sílica gel.  Ha permitido conservar hongos por 25 años <b>sin variación</b> en la constitución genética.	La técnica es limitada a hongos que producen esporas y no es adecuada para hongos como <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> y otros <i>Oomycota</i> que producen micelio u otros hongos con esporas delicadas o complejas

Tomado de Smith y Onions (1994)

<sup>1</sup> Guzmán M. 2000. Conservación e inoculación de *M. fijiensis* (entrevista). La Rita, CR, CORBANA.

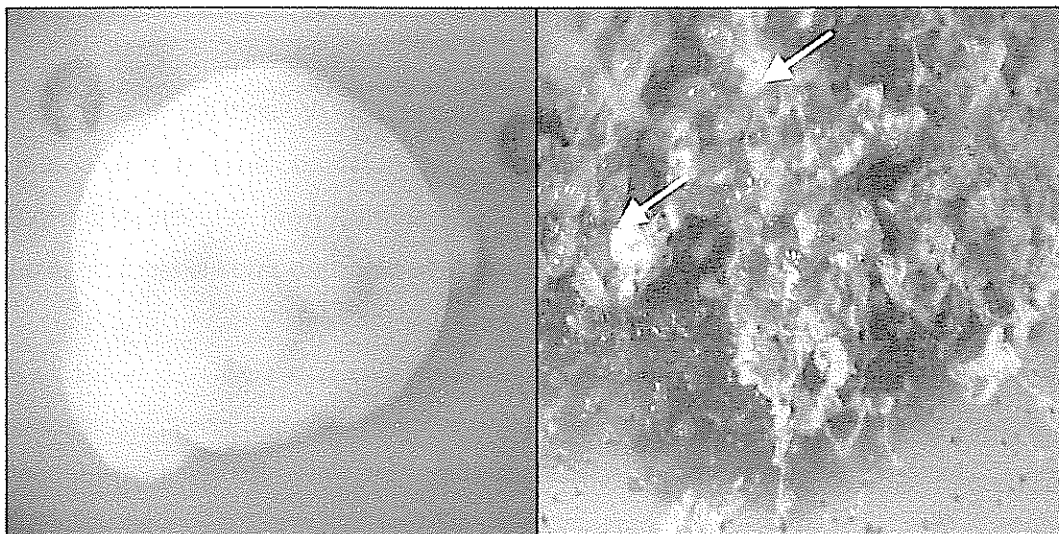


Fig. 3. Contaminación por ácaros en colonias de *M. fijiensis* creciendo activamente. Izquierda: colonia libre de ácaros. Derecha: colonia devorada por ácaros. Nótese el grado de deterioro sufrido.

### 2.6.2 Crioconservación de hongos fitopatógenos

Los hongos patógenos son difíciles de mantener en cultivo puro sin pérdida de patogenicidad, virulencia y la habilidad de esporular (Dahmen *et al.* 1983). Es por ello que se propone el uso de la crioconservación, la cual se refiere al almacenamiento de un organismo viviente a temperaturas ultra bajas tal que después de la congelación pueda recuperar su actividad metabólica normal (Brand 2000).

En ese sentido, García *et al.* (1995) y Croan *et al.* (1999) hacen notar la necesidad de almacenar los organismos a una temperatura mínima de  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la cual puede lograrse con el uso de nitrógeno líquido; lo que asegura el cese de las funciones de crecimiento y metabolismo. De esta forma se garantiza la estabilidad genética del espécimen por tiempo indefinido.

Sin embargo, para la conservación exitosa de organismos en NL, se requiere la regulación de factores físicos y químicos.



El control del estado del agua durante la criocongelación es el principal factor en el desarrollo de estrategias de crioprotección y limitación de daño en la célula, como lo describen Fujikawa y Jitsuyama (2000), quienes aseguran que la formación intracelular de hielo es fatal para las células en todos los tejidos biológicos. La formación de una gran cantidad de hielo en el interior de la célula hace que estas estén sujetas a sufrir cambios ultraestructurales dañinos durante la descongelación.

En células de *Citrus deliciosa* criocongeladas en NL, Aguilar *et al.* (1993), observaron, en células proembriogénicas, cambios en la forma de esfera del núcleo o la desaparición de la membrana nuclear; mientras que en células diferenciadas el principal daño fue la ruptura y deformación de la pared celular.

Para disminuir el riesgo de destrucción de la membrana celular se recomienda deshidratar la célula, de tal forma que su volumen sea reducido; así se evita la ruptura de la membrana debido a un aumento excesivo del volumen interno al congelarse. Se debe tomar en consideración que existen niveles de tolerancia de las células a la deshidratación y diferente capacidad de resistencia mecánica a la reducción del volumen, como lo advierten Meryman y Williams (1985). Así mismo, estos autores agregan que una excesiva deshidratación de la célula ha sido asociada con cambios en la membrana, específicamente, incremento en permeabilidad y pérdida del material estructural. En tanto, el daño físico no es la única causa de las lesiones letales en la célula.

Dumet y Benson (2000), refieren que también existe la posibilidad de daño en el ámbito bioquímico, señalando que el estrés al que se someten los tejidos durante el proceso de criocongelación puede promover cambios subletales, tal como el desacoplamiento metabólico, el cual incide en la producción de radicales libres tóxicos, con el (OH) y el súper oxido ( $O_2^-$ ) como los más importantes. Estas moléculas poseen electrones no apareados que pueden causar daño al extraer electrones de macromoléculas esenciales como lípidos, proteínas y ADN.

Los tiempos de almacenamiento indefinido requieren que el organismo sea mantenido debajo de la temperatura a la cual el agua congelada ya no sublima y recrystaliza,

aproximadamente  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aunque los congeladores usados para almacenamiento a ultra bajas temperaturas pueden estabilizar algunas células vivientes, durante semanas o incluso años, se requiere de nitrógeno líquido para periodos de almacenamiento más largos.

Con el uso de las técnicas de crioconservación se permite la conservación de polen (Towill y Walters 2000), meristemas, embriones cigóticos y somáticos, callos embriogénicos (Abdelnour-Esquivel y Escalant 1994 y Engelmant *et al.* 1994), suspensiones celulares (Aguilar *et al.* 1993) y estructuras de hongos (Chandler 1994, Dahmen *et al.* 1983, Smith 1982).

Autores como Dahmen *et al.* (1983), Chandler (1994), Berny y Hennebert (1991) y Stalpers *et al.* (1987) consideran la conservación de hongos por inmersión en NL como el método más confiable para el almacenamiento de hongos a largo plazo; incluso en vapor de nitrógeno líquido; debido a su confiabilidad, costo relativamente bajo y ausencia de procedimientos complicados. La posible desventaja de la crioconservación, según Stalpers *et al.* (1987), incluye el riesgo relacionado con el constante abastecimiento de nitrógeno líquido.

Según Smith (1982) una de las principales ventajas de conservar hongos en NL es que permite mantener colecciones de hongos vivos, los cuales son incapaces de crecer continuamente sobre medio de cultivo, o bien, sufren cambios o deterioro cuando se mantienen bajo el método de transferencias frecuentes. Otra de las ventajas más importantes que se adjudica a este tipo de conservación es descrita por Long *et al.* (1978), quienes afirman que hongos con problemas de mutación pueden ser almacenados en la fase gaseosa del NL, por tiempo indefinido, sin cambios en su constitución genética.

En el caso específico de *M. fijiensis*, Guzmán<sup>1</sup>, logró resultados poco satisfactorios en su trabajo sobre conservación de suspensiones de conidios o partes de micelio de este hongo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en cámara de congelación, debido a que más del 80% de los aislamientos no tuvieron la capacidad de desarrollarse luego de la descongelación y los que lograron recuperarse mostraron crecimiento lento. Además, otro factor a

tomar en cuenta fue la pérdida de algunas cepas del hongo debido a desperfectos en la cámara de congelación y la ausencia de medios para practicar la conservación con NL.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Localización de la investigación

Los trabajos de laboratorio e invernadero fueron realizados en las facilidades del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), entre los meses de febrero y noviembre del 2001.

El CATIE se localiza en la ciudad de Turrialba, Costa Rica. A una altitud de 602 msnm a 9° 55'21" N y 83° 39'40" O; con valores anuales promedio de temperatura, precipitación y humedad relativa de 21.7 °C, 2.065 mm y 87%.

#### 3.2 Material experimental

##### 3.2.1 *Material vegetal*

Para la evaluación de los tratamientos se utilizaron plantas de banano (AAA) de la variedad Gran Enano susceptible a la Sigatoka negra (Fouré 1991). Tales plantas fueron reproducidas por cultivo *in vitro* en el laboratorio Cristal Vitro (Costa Rica).

Las plantas fueron sembradas en maceteros plásticos Polyplast N° 500 de aproximadamente 5 Kg de capacidad usando suelo esterilizado en hornos a 100 °C por cuatro horas. Una semana posterior a la siembra y cada cuatro semanas las plantas fueron fertilizadas con 10 gramos de la fórmula completa NPK 12-24-12. Además, cada tres semanas fueron fertilizadas con el abono foliar (Bayfolan®) a razón de 6ml/l de agua.

Dependiendo de las condiciones meteorológicas, se aplicó riego a la base de las plantas para mantener la tierra a capacidad de campo.

### 3.3 Cepas del patógeno

Se evaluaron diez cepas de *Mycosphaerella fijiensis*, provenientes de diferentes zonas productoras de banano del atlántico de Costa Rica (Cuadro 2). Los procesos de descarga de ascosporas a partir de muestras foliares y el cultivo monoascospórico fueron llevados a cabo en los laboratorios de Fitopatología de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) y el CATIE, por el personal de esos Centros de investigación.

Cuadro 2. Lugar de procedencia de las cepas evaluadas.

Código de cepa	Procedencia
A #1 *	28 millas, Limón, Costa Rica
C #2 *	San Carlos, Alajuela, Costa Rica
E #3 *	Valle de La Estrella, Limón, Costa Rica
M6 #35 *	BriBri, Limón, Costa Rica
M10 #27 *	BriBri, Limón, Costa Rica
LF Roxana **	Roxana, Limón, Costa Rica
Urania 37 ***	Cariari, Limón, Costa Rica
Urania 19 ***	Cariari, Limón, Costa Rica
PAIS 9 ***	Sixaola, Limón, Costa Rica
PAIS 18 ***	Sixaola, Limón, Costa Rica

\* Cepas facilitadas por el M. Sc. Galileo Rivas

\*\* Cepa aportada por el Ing. Luis F. Patiño

\*\*\* Cepas facilitadas por CORBANA

### **3.4 Metodología**

#### **3.4.1 Preparación del medio para cultivo**

Para el cultivo del hongo se usó el medio nutritivo a base de jugo de vegetales (V-8), preparado según lo describe González (1999). Luego de su elaboración y esterilización, se adicionó 2g/l de sulfato de estreptomicina para reducir la posibilidad de contaminación por bacterias. El medio, dentro de la cámara de flujo, fue dispensado en platos de Petri de 60 x 15 ml, en cantidad de 10 ml en cada uno.

#### **3.4.2 Preparación del medio para crioconservación (MCC)**

Para la congelación de los propágulos de *M. fijiensis* se usó una suspensión de agua + aceite mineral al 0,5%, la cual fue esterilizada dos veces en autoclave por 20 minutos a 121°C.

#### **3.4.3 Multiplicación de las cepas**

Dentro de la cámara de flujo laminar, a cada plato Petri con crecimiento activo de colonias de *M. fijiensis* se le agregó 10 ml del MCC, previa agitación. Con ayuda de pinceles N° 12 se realizó un barrido sobre la colonia para liberar los conidios y fragmentar el micelio. Con un gotero estéril, la suspensión de propágulos fue transferida a un beacker y agitada por 10 minutos. Pasado ese tiempo, con una micropipeta se tomaron muestras de 0,25 ml cada vez, las cuales fueron colocadas en platos Petri con medio V-8 fresco. Los platos inoculados fueron colocados en una incubadora programada con periodos de 12 horas de luz/oscuridad a 26 °C, durante quince días. Esas condiciones, según Fullerton y Olsen (1995), usualmente inducen una profusa esporulación.

#### **3.4.4 Tratamientos evaluados**

Cumplidos los 15 días de incubación, los platos fueron colocados en la cámara de flujo laminar. Posteriormente, les se agregó 5 ml de MCC a cada uno y se barrió sobre el hongo con un pincel N° 12. La acción fue repetida para tratar de coleccionar la mayor cantidad de propágulos posibles. La suspensión obtenida fue transferida a un beaker y agitada por 10 minutos para homogenizarla. Pasado el tiempo de agitación, se tomaron tres muestras de 0,25 ml que fueron colocadas en cajas Petri con el medio de cultivo (testigo). Otras tres muestras de 1,0 ml cada una fueron colocadas en criotubos y congeladas por inmersión directa en nitrógeno líquido durante dos horas. Pasado ese tiempo, las muestras fueron rápidamente descongeladas por inmersión en baño maría a 40°C durante tres minutos y de cada criotubo se tomó una muestra de 0,25 ml que fue colocada en una caja Petri con medio (tratamiento +NL). El resto de la suspensión fue dejada en reposo durante dos horas, luego de ese periodo, se agitó de nuevo y se tomaron tres muestras de 0,25 ml que se colocaron, igualmente, en cajas Petri con medio de cultivo.

Por último, las cajas con las muestras (tratamientos) fueron colocados en la incubadora, bajo las mismas condiciones descritas en el acápite 3.4.3.

#### **3.4.5 Recuperación de las cepas criocongeladas**

La recuperación de las cepas del hongo, que en términos de este trabajo fue definida como el área del medio de cultivo invadida por el hongo, fue evaluada de forma visual al completarse los 15 días de incubación, con ayuda de una escala de referencia diseñada para este caso (Anexo 1.A). Para cada tratamiento, se evaluaron los tres platos y se promediaron los valores obtenidos.

#### **3.4.6 Evaluación de la producción de conidios de las cepas criocongeladas y estandarización de inóculo**

Después de quince días de incubación de los hongos tratados (acápites 3.4.4), los

platos que los contenían fueron retirados de la incubadora, paso seguido, se les agregó 5 ml de agua y se realizó el procedimiento de barrido con pinceles. La suspensión obtenida fue filtrada a través de una malla metálica con una trama de 7 x 7 micras; el filtrado resultante fue agitado y dos muestras cada vez fueron colocadas en un hemacitómetro. Luego, con la ayuda de un microscopio se procedió a realizar el conteo de los conidios. La lectura se realizó en los cinco campos principales (CP), cuatro esquinas y el centro, del hemacitómetro y el promedio fue multiplicado por 2.000 (factor de conversión) con lo que se obtuvo la concentración de conidios por ml de esa muestra (1). La cantidad de conidios en cada tratamiento fue tomada como la variable de estudio y fue registrada para su posterior análisis.

Una vez hecho el conteo de los conidios para cada muestra (repeticiones) de cada tratamiento, se procedió a estandarizar la suspensión en 10 000 conidios por mililitro (2) para ser usada en la inoculación de las plantas en el invernadero. Las fórmulas usadas fueron las descritas por González (1999):

$$(1) \frac{nc}{5CP} * 2000 = \text{conidios} / \text{cc} ; \text{ donde : } nc = \text{número de conidios}$$

$$(2) \frac{\text{conidios} / \text{cc}}{\text{conidios} / \text{ccdeseado}} * vto = vf ; \text{ donde: } vto = \text{volumen total original, } vf = \text{volumen final.}$$

#### **3.4.7 Evaluación de patogenicidad de las cepas criocongeladas**

La inoculación y las observaciones sobre el avance de la enfermedad se realizaron en las plantas de banano previamente cultivadas en el invernadero. Para ello se tomaron como variables: el periodo de incubación (PI), periodo de transición (PT), el periodo de latencia (PL) y el periodo a necrosis total (NT) del área aplicada; los cuales se describen en acápites posteriores.



### 3.4.7.1. Inoculación de plantas

Por cada tratamiento, fueron inoculadas tres plantas de banano cv Gran Enano sobre la superficie abaxial de sus tres hojas más jóvenes. Para ello se utilizó la suspensión obtenida después de realizar el conteo de conidios, la cual fue estandarizada en 10 000 conidios/ml. Con el fin de favorecer la adherencia de los propágulos a la hoja, se le añadió a la suspensión gelatina en lámina al 1%. Tres mililitros de la suspensión fueron aplicados en cada hoja con ayuda de un aplicador DeVilbiss, dentro de un área de 100 cm<sup>2</sup> (10 x 10 cm), demarcada con la ayuda de un molde hecho de lámina plástica, recomendada por Guzmán<sup>1</sup>.

Durante los cinco días posteriores a la aplicación del inóculo, y para favorecer las condiciones para la germinación y desarrollo de los propágulos, las plantas fueron sometidas a condiciones de alta humedad y temperatura dentro de una cámara húmeda construida para tal efecto (Fig. 4). Antes de introducir las plantas inoculadas en la cámara, fueron dejadas por espacio de treinta minutos en un lugar seco para lograr que la suspensión de propágulos aplicada se secase, con la intención de evitar que la suspensión fuera lavada por el agua.

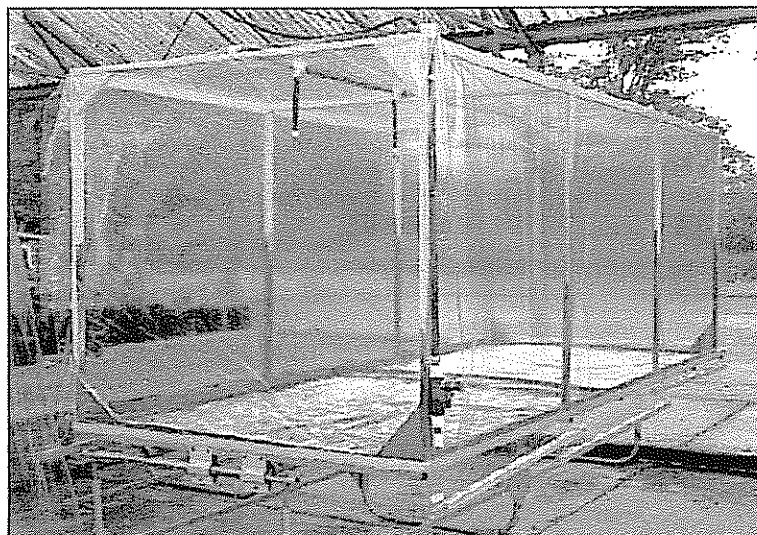


Fig. 4. Cámara usada para favorecer condiciones de alta humedad durante los cinco días posteriores a la inoculación de las plantas de banano con las cepas crioconservadas en nitrógeno líquido.

---

<sup>1</sup> *idem*

Dentro de la cámara el agua fue aplicada a través de un sistema de aspersión, en periodos de 15 minutos cada media hora. Pasados los cinco días, las plantas fueron colocadas en las mesas del invernadero donde permanecieron hasta el final del periodo de evaluación.

#### **3.4.8 Medición de las condiciones meteorológicas**

Las condiciones de temperatura y humedad dentro de la cámara húmeda y en el invernadero fueron registradas con la ayuda de equipo especializado. Para determinar las condiciones dentro de la cámara, se usaron dos sensores (Temp Tale®), los cuales registraron las variaciones de las variables cada hora (Fig. 6). Las condiciones en el invernadero fueron medidas por medio de un higrotermógrafo, el cual graficó las variaciones sobre una cartilla. Las variaciones meteorológicas fueron agregadas a la base de datos con una frecuencia de cada dos horas.

#### **3.4.9 Variables evaluadas**

Para la evaluación de los síntomas se tomó como referencia la escala compilada por Tapia (1993) en el Cuadro 1. La metodología de evaluación se realizó siguiendo la recomendación de Guzmán<sup>1</sup>. Sin embargo, debido a que los síntomas que produce *M. fijiensis* cuando es inoculado en plantas jóvenes no son idénticos a los presentados en plantas maduras, el estado dos de la enfermedad, usado para definir el PI, fue establecido de acuerdo a lo definido por Fullerton y Olsen (1995), quienes lo describen como la presencia de síntomas evidentes en la superficie adaxial de la hoja, como un bloque de pequeñas manchas difusas, generalmente causadas por decoloración de la clorofila (Figura 5).

---

<sup>1</sup>*idem*

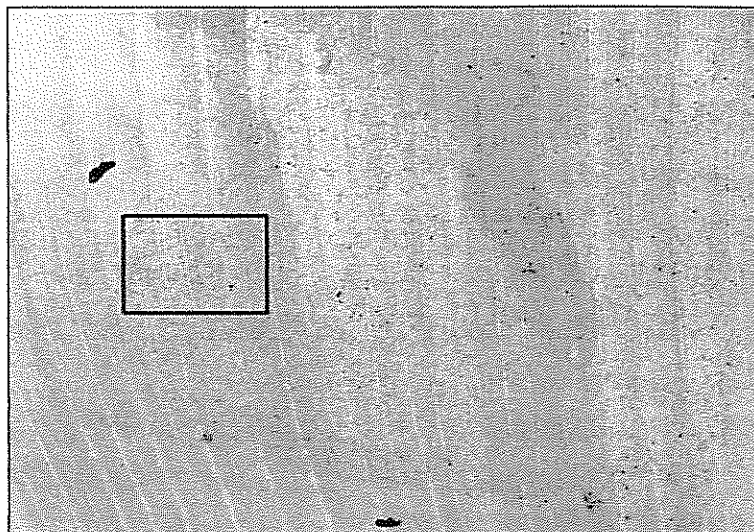


Fig. 5. Lesiones en estado dos de infección en hojas de plantas jóvenes de banano (Gran Enano) inoculadas artificialmente con *M. fijiensis*. Nótese en el recuadro los pequeños bloques (agrupamiento) de manchas difusas de color café claro en la superficie abaxial de la hoja.

#### ***Periodo de incubación (PI)***

El periodo de incubación es el tiempo, en días, que transcurre entre la inoculación y la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad. De este modo, el periodo de incubación fue determinado en el momento en que la hoja presentó las primeras 10 lesiones.

#### ***Periodo de transición (PT)***

El periodo de transición fue definido como el número de días que suceden entre el PI y la presencia de las primeras 10 manchas maduras (estado IV).

#### ***Periodo de latencia (PL)***

Este periodo es determinado como el número de días desde la aparición de las primeras estrías (PI) hasta que alcanzó diez manchas con el centro necrótico (estado VI).

### **Periodo a Necrosis Total (NT)**

Este se definió como el número de días necesarios desde la inoculación hasta el momento en que el tejido necrosado fue igual al 100% del área de 100 cm<sup>2</sup> que fue inoculada.

### **3.5 Diseño experimental para evaluar la producción de conidios y la prueba de patogenicidad de las cepas criocongeladas**

Para la comparación de los tratamientos se empleó el Diseño Irrestricto al Azar con un nivel de significancia de 0.05, cuyo modelo lineal aditivo es:

$$Y_{ij} : \mu + \tau_i + e_{ij} \quad \text{donde } Y_{ij} = \text{variable de respuesta del } i\text{ésimo tratamiento en la } j\text{ésima repetición}$$

$\mu$  = media general  
 $\tau_i$  = efecto del  $i$ ésimotratamiento desde  $i=1$  hasta  $i=3$   
 $e_{ij}$  = error experimental asociado en el  $i$ ésimotratamiento en la  $j$ ésima repetición desde  $j=1$  hasta  $j=3$

Debido a que los valores obtenidos no mostraron una distribución estadística normal, fue necesaria su transformación usando la función trigonométrica de seno para el caso de las variables para la prueba de patogenicidad y la ecuación de logaritmo natural (LN) para la evaluación de la producción de conidios.

#### **3.5.1 Análisis de los datos**

La información de interés se centró en las diferencias que existieron entre los tratamientos dentro de cada cepa, debido a que el objetivo de la investigación fue comparar el comportamiento biológico de las cepas luego del periodo de congelación en nitrógeno líquido.

Los datos fueron analizados con ayuda del programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 8.0, mediante el procedimiento GLM, dentro del cual se

estimó la diferencia de las medias de los tratamientos por medio de análisis de variancia y con la comparación de medias por el criterio de Duncan.

#### **3.4.9 Estudio histológico**

Una muestra de 1,0 ml de la suspensión congelada (+NL) y otra muestra de la suspensión no congelada (testigo) de cada aislamiento, fueron usadas para estudiar la estructura celular con el fin de determinar los posibles cambios físicos sufridos durante el proceso de congelación y descongelación.

Las muestras (suspensión de propágulos) fueron confinadas dentro de bloques de agar-agua al 1%. Para ello, se preparó la solución agar-agua que luego fue vertido sobre las muestras contenidas en tubos desechables para centrífuga, de 2 ml de capacidad. Los tubos fueron cortados una vez que el agar gelificó y los propágulos quedaron de esta forma atrapados en bloques de agar. Los bloques resultantes, fueron colocados en solución fijadora de Glutaraldehido-Paraformaldehido durante una noche a 4 °C. Luego fueron deshidratados por inmersión sucesiva de una hora cada vez en una serie ascendente de etanol en concentración de 50, 70, 80, 90, 95 y 100 %, este último dos veces.

Luego de deshidratadas, las muestras fueron sumergidas en historesina Reichert-Jung a 4 °C durante toda la noche. Seguidamente, fueron colocadas en moldes plásticos con una mezcla de historesina más endurecedor (1:1) con el fin de facilitar su polimerización. Los bloques polimerizados fueron cortados a 4 micrómetros de grosor con un micrótomo de rotación. Una vez hechos los cortes, se procedió a la tinción utilizando la técnica Schiff-Naphtol Blue Black (CIRAD 1989).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Multiplicación de las cepas

El inicio de la multiplicación de las cepas utilizadas en el presente trabajo fue difícil ya que al tomar las cepas originales, mantenidas en crecimiento activo, muchas de ellas presentaron niveles de contaminación bacterial muy altos, que retrasó el desarrollo de la investigación. Posteriormente, una vez superado el problema mediante la adición de sulfato de estreptomicina (2grs/l) al medio de cultivo, todas las cepas crecieron muy bien. Esto implica que hubo un buen desarrollo de las colonias en cada uno de los materiales.

### 4.2 Tratamientos de criocongelación.

Una vez establecido el patógeno en el plato Petri, con fines de criocongelación, el manejo del mismo, dependiendo de la cepa, mostró diferencias en cuanto a consistencia de la masa miceliar. Esto hizo que para algunas cepas la labor de barrido con el pincel fuera más sencillo, pues, debido a su consistencia suave, permitió desprender los conidios y sobre todo, partes de micelio con gran facilidad. Otras cepas mostraron una mayor consistencia que originó el uso de fragmentos más grandes de micelio en el proceso de criocongelación.

### 4.3 Recuperación y producción de conidios de las cepas criocongeladas

#### 4.3.1 Recuperación de las cepas

El crecimiento de las cepas, luego del periodo de congelación en NL, permitió observar diferentes niveles de invasión del patógeno en el medio de cultivo (Fig. 6). En el testigo y el tratamiento -NL se observó una buena capacidad de invasión para todas las cepas, sin embargo en el tratamiento +NL, se apreció poco desarrollo de colonias sobre el medio de cultivo, en seis de las diez cepas criocongeladas.

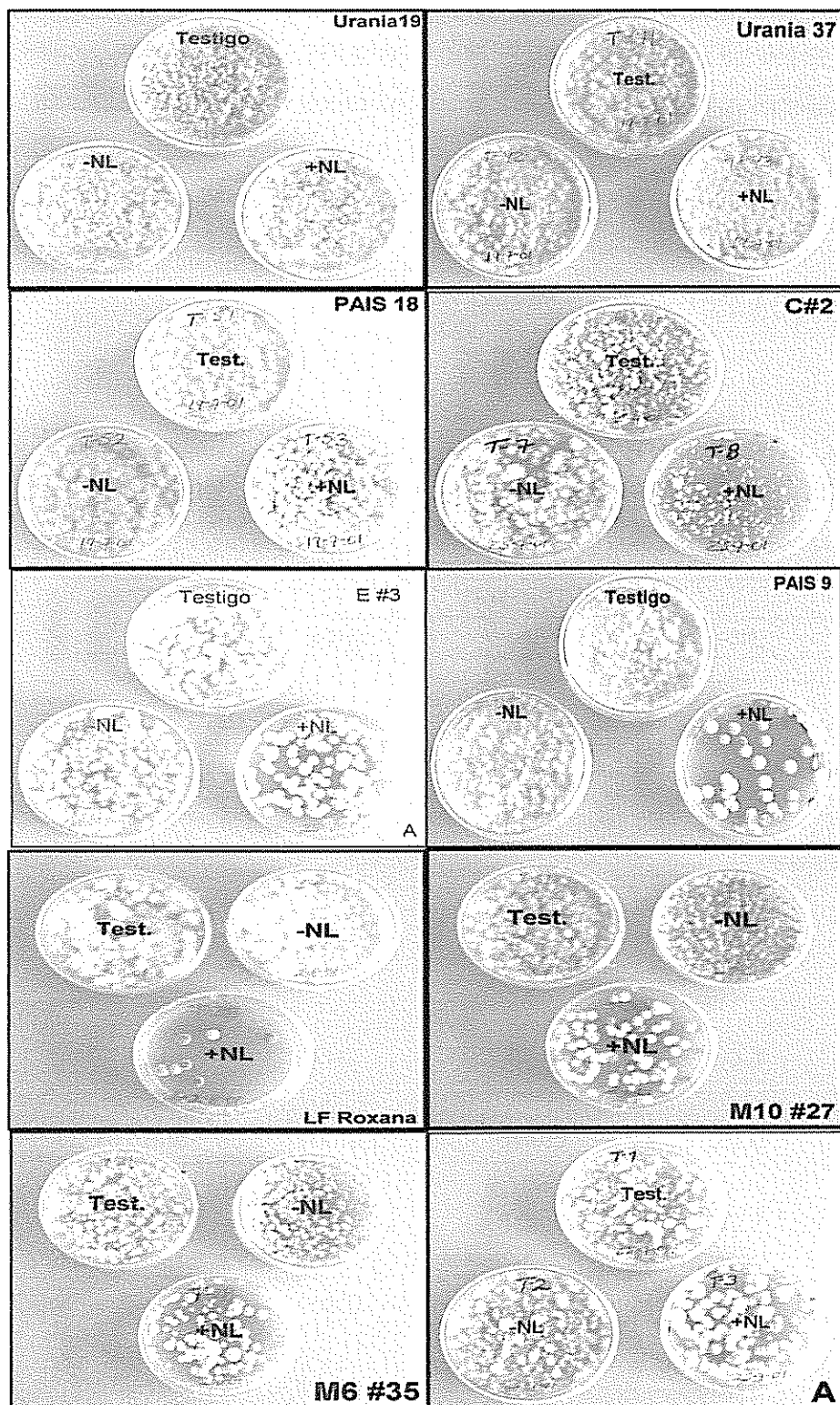


Figura 6. Respuesta de 10 cepas de *M. fijiensis*, crecidas durante 15 días a 26 °C y 12/12 periodos de luz-oscuridad luego de ser crioconservadas (+NL) o no (-NL y Test.) en nitrógeno líquido.

Específicamente, con el tratamiento -NL y el testigo, los propágulos crecieron y lograron invadir, en promedio, entre el 85 y 100 % de la superficie del medio, mientras que en el tratamiento +NL los valores se ubicaron entre 20 y 82%; a excepción de las cepas PAIS 18, Urania 37 y Urania 19, las que mostraron valores entre 90 y 100%. La cepa LF Roxana fue la que mostró la menor recuperación (20%) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores promedio de recuperación (invasión) de las cepas de *M. fijiensis* sobre el medio de cultivo como respuesta al tratamiento de crioconservación.

Cepa	Tratamiento		
	Testigo	-NL	+NL
A#1	100.0	96.7	81.7
C#2	100.0	100.0	61.7
E#3	100.0	100.0	76.7
M6#35	91.7	85.0	56.7
M10#27	93.3	85.0	53.3
LF Roxana	100.0	100.0	20.0
Urania 37	100.0	100.0	96.7
PAIS 9	100.0	100.0	46.7
PAIS 18	100.0	100.0	90.0
Urania 19	100.0	100.0	100.0



Es importante destacar que en las cepas que presentaron los valores máximos de invasión, se observó el desarrollo de colonias y abundante micelio; lo que ayudó para que el mayor porcentaje de la superficie del medio fuera cubierto. En el caso de las cepas con valores de invasión mínimos, se distinguió un crecimiento pobre o nulo del micelio y en su lugar sólo se desarrollaron sobre el medio, colonias en forma aislada.

La inmersión directa en nitrógeno líquido pudo provocar plasmólisis de las células del micelio debido a la ruptura de sus paredes. Esto pudo estar determinado por el aumento en volumen del contenido celular; por efecto de la formación de cristales de hielo durante la congelación, tal y como ha sido observado por Smith y Onions (1994) en micelio de *Serpula lacrymans*. Esta respuesta al proceso de criocongelación, donde se observan áreas de micelio dañado, va a influir notablemente sobre la recuperación de las cepas, posterior al tratamiento de criocongelación. Aquí cabe resaltar que luego de la criocongelación, se toma una alícuota de 0,25 ml de la suspensión, que es utilizada para la iniciación de las nuevas colonias. Esto implica que muchas de las muestras puestas a crecer sobre el medio de cultivo, llevaban gran cantidad de micelio dañado por efecto del proceso. Esto pudo incidir en la capacidad de invasión de las cepas, debido a que el micelio criocongelado, como parte de la suspensión de propágulos, no fue capaz de recuperarse (germinar y crecer) con lo que resultaría obvio la menor invasión del medio, mostrada por algunas cepas..

Similares observaciones, en otro tipo de células, fueron hechas por Aguilar *et al.*(1993) durante la crioconservación de suspensiones celulares de *Citrus deliciosa*, en las cuales se apreció la ruptura de la membrana celular en parte de esa suspensión estudiada. En esa investigación se manifiesta, además, que la crioconservación desencadena un proceso de selección celular, que provocaría que sólo las células mejor capacitadas en su estructura y contenido citoplasmático (i.e. contenido de almidones) puedan regenerarse, con la consecuente muerte de las células no aptas.

En observaciones realizadas con ayuda del microscopio de luz, sobre muestras de suspensiones testigo y otras congeladas en NL, se pudo constatar el deterioro del micelio (Fig. 7) en algunas de las muestras congeladas, mismas que presentaron los más bajos niveles de recuperación. La forma en que se presenta arreglado el micelio

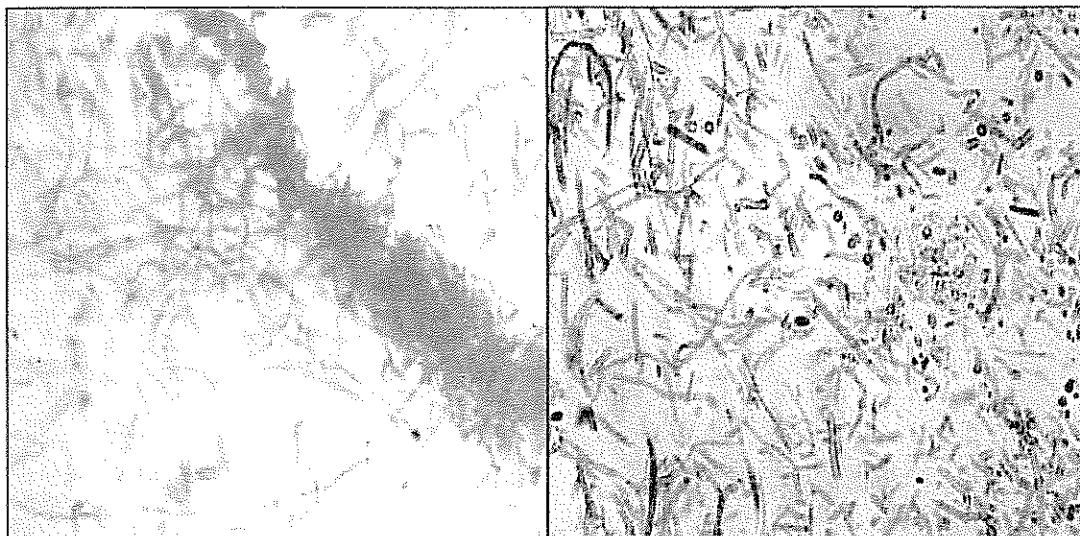


Fig. 7. Izquierda: deterioro del micelio observado en muestras congeladas en nitrógeno líquido (-196 °C). Nótese la aglomeración de micelio en algunos sectores. Derecha: patrón de distribución del micelio sano en muestras testigo.

puede darse, según Smith y Onion (1994), como respuesta al congelamiento en nitrógeno líquido y, a su vez, indica que ese es tejido muerto. Estos resultados fueron corroborados con ayuda del colorante Acridine -orange, recomendado por Neergaard (1997), como una tinción que permite mostrar la viabilidad de estructuras fungosas.

El deterioro de la masa miceliar puede estar ligado a una reducida efectividad del medio crioprotectante (agua destilada + aceite mineral al 0.5%) usado en esta investigación. Croan *et al.* (1999) obtuvieron un 100 % de recuperación de muestras de micelio de hongos Basidiomicetes cuando usaron glicerol al 10% como crioprotectante. Similar resultado obtuvieron Hwang *et al.* (1976) usando 104 cepas entre hongos Basidiomicetes, Ascomicetes y Phycomicetes.

#### 4.3.2 Producción de conidios

Todas las cepas criocongeladas, durante su recuperación sobre medio de cultivo, mostraron ser capaces de producir conidios. En seis de las diez cepas, la cantidad de conidios producidos, luego del periodo de criocervación (tratamiento +NL), no mostró diferencia estadística con el testigo; mientras que con el tratamiento -NL no se encontró diferencias estadísticas con el testigo en ninguno de los casos.

Con base en el análisis estadístico (Anexo 2.A), se identificaron diferencias entre los tratamientos para las cepas LF Roxana, PAIS 18 y PAIS 9. El tratamiento +NL mostró una producción de conidios más baja con respecto al tratamiento -NL y el testigo. En las restantes cepas, no se encontraron diferencias entre los tratamientos.

Esta respuesta indica que existe un efecto negativo de la criocervación, por inmersión directa en NL (-196 °C), sobre la producción de conidios en ciertas cepas de *M. fijiensis*. Es de notar que esta situación se relaciona con el grado de recuperación de las cepas, ya que el desarrollo de colonias y la abundancia de micelio indican la posibilidad de que una gran cantidad de conidióforos, y consecuentemente conidios, se están produciendo. Por lo tanto, al existir menor cantidad de hifas vivas se esperaría una menor cantidad de dichas estructuras reproductivas en el tratamiento +NL con respecto al -NL y el testigo.

A pesar de las diferencias encontradas, según se aprecia en la Figura 8 (Anexo 3.A), la producción promedio de conidios fue mayor a 150 000 unidades por mililitro en todas las cepas, para todos los tratamientos, con excepción de la cepa LF Roxana, en la que el patógeno bajo el efecto del tratamiento +NL produjo menos de 30 000 conidios por unidad de volumen.

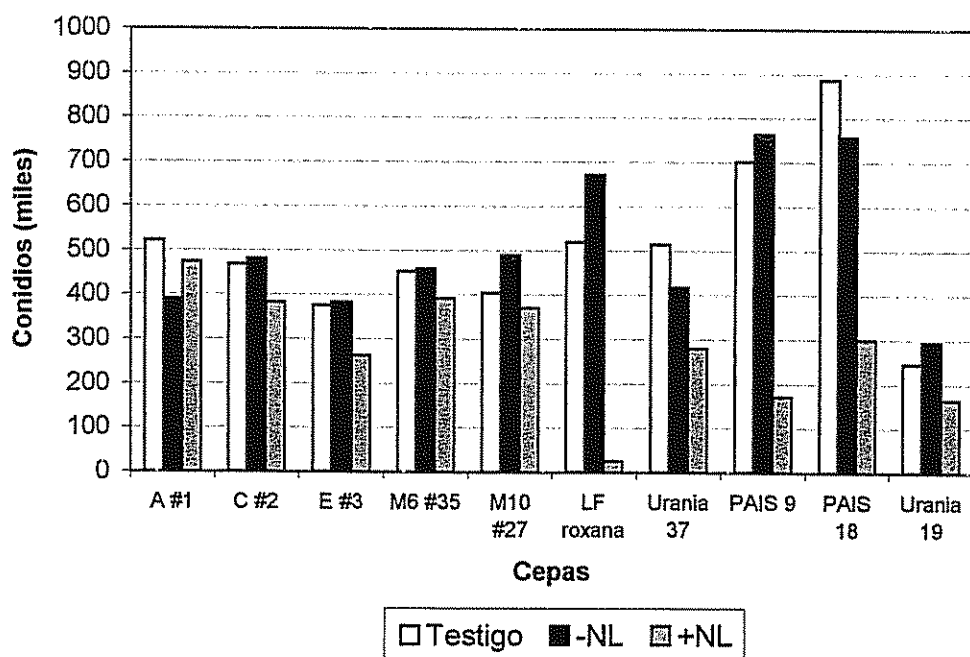


Fig. 8. Respuesta de la producción de conidios de 10 cepas de *M. fijiensis*, crecidas durante 15 días a 26 °C y periodos de 12 horas de luz-oscuridad luego ser crioconservadas (+NL) o no (-NL y Test.) en nitrógeno líquido.

En los conidios observados con el microscopio, tanto en las muestras no criocongeladas como las criocongeladas, no se advierte daño estructural, ya que no se colapsó o dañó la pared después de la congelación en NL. Asimismo, se caracterizaron por un citoplasma muy denso cuando se colorearon con Toluidina azul y el colorante de Alexander (1980). Puede observarse que el grosor de la pared del conidio es mayor que la del micelio (Figura 9) y aunque no pudo observarse en nuestros estudios histológicos, el contenido de almidones, es también mayor en los conidios. Aparentemente, por ser el conidio una estructura de resistencia, probablemente tiene bajo contenido de agua y una elevada concentración de solutos en su interior; lo que sumado al grosor de su pared, favorece la tolerancia a temperaturas ultra bajas (Holden y Smith, 1992).

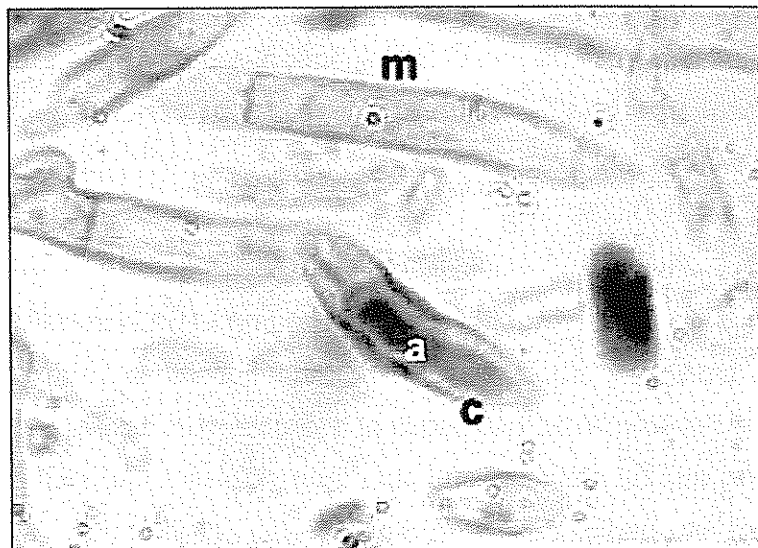


Fig. 9. Histología de estructuras (conidios y micelios) de *M. fijiensis* después de la congelación en NL. El conidio presenta una pared más gruesa (c) con mayor contenido de almidón (a) en comparación al micelio (m).

Croan *et al.* (1999) afirman que el grosor de la pared del conidio asegura la sobrevivencia de esa estructura bajo condiciones adversas de frío, desecación, presión física y abrasión. Además, González-Arno *et al.*, citados por Aguilar *et al.* (1999), relacionan la tolerancia a la congelación con la acumulación de azúcar y almidón en el interior de la célula.

Otra causa que puede explicar los resultados obtenidos en esta fase del experimento, es la velocidad de descongelamiento a la que fueron sometidos los hongos. Goos *et al.* (1967) reconocen que la supervivencia de hongos congelados en NL depende directamente de este factor. Existen hongos que han mostrado, después de una congelación directa en NL, mejor respuesta a la descongelación rápida (baño María), mientras que otros a la descongelación lenta (a temperatura ambiente). Esto puede asociarse al contenido de agua congelable durante el proceso de crioconservación aplicado.

De manera general, Croan et al. (1999) y Hwang et al. (1976), hacen la observación de que la susceptibilidad al daño por la congelación es dependiente de la característica (genéticas) de cada cepa, más que a las peculiaridades de las técnicas de criopreservación. No obstante, debido a la falta de estudios, no se puede generalizar.

Si bien existe diferencia en el ámbito estadístico, la producción de conidios es acorde con el objetivo de la criopreservación. Es decir, mantener las estructuras reproductivas por tiempo indefinido con la capacidad de regenerar un nuevo individuo y a su vez este sea capaz de continuar reproduciéndose. Lo que permite contar con material infectivo para trabajos de investigación dentro o fuera del hábitat natural del hongo.

#### 4.4 Condiciones meteorológicas

La Figura 10 muestra el comportamiento de la temperatura y la humedad relativa en el interior de la cámara húmeda usada durante cinco días con plantas de *cultivo in vitro* inoculadas con la suspensión de *M. fijiensis*. La temperatura ( $T_p$ ) mostró la mayor fluctuación, con un máximo de 45 °C y una mínima de 21°C. Aunque hubo momentos con temperatura mayor a 38 °C, la que según Porras y Pérez (1997) es detrimental para el crecimiento del tubo germinativo de las esporas de *M. fijiensis*, estos periodos se dieron por muy corto tiempo, lo que no representó obstáculo para la germinación y penetración de las esporas en la hoja.

Del comportamiento de la humedad relativa (HR) dentro de la cámara húmeda, resalta el valor mínimo de 60% y el máximo de 100 %. A pesar de presentarse periodos de humedad por debajo de 92%, no aptos para el buen desarrollo de las esporas (Jacome et al. 1991), estos no incidieron sobre ellas y los periodos de alta humedad (entre 90 y 100%) fueron lo suficientemente largos y frecuentes para satisfacer las condiciones apropiadas para la germinación y el desarrollo de los propágulos.

Dentro del invernadero (Fig. 11) es de notar que la temperatura se mantuvo entre 18 y 31 °C durante todo el periodo de evaluación. Al igual que para las condiciones dentro

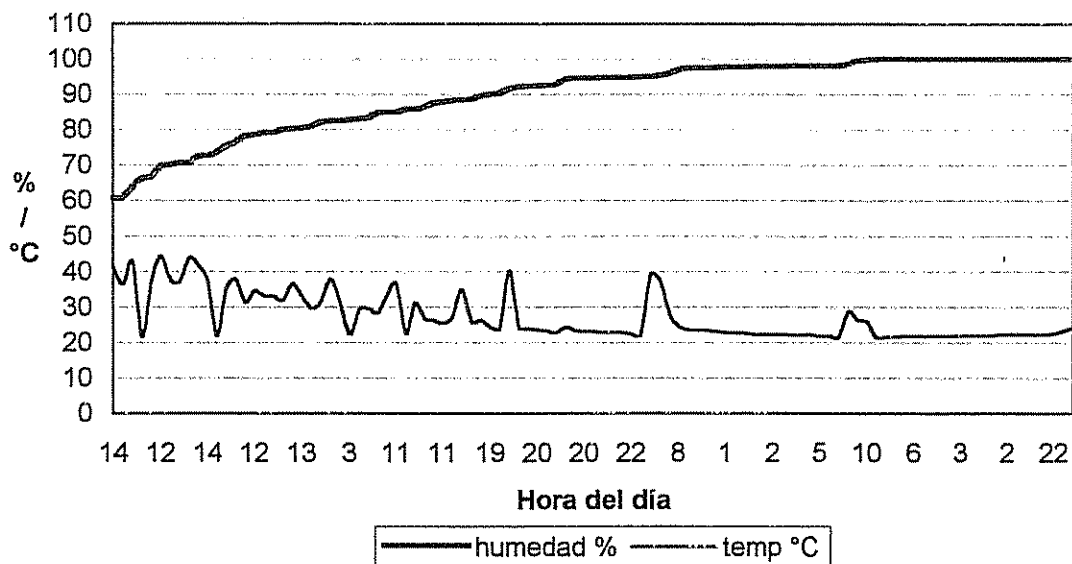


Fig. 10. Tendencia de la temperatura y la humedad relativa dentro de la cámara húmeda construida para la evaluación de la patogenicidad de las cepas de *M. fijiensis*.

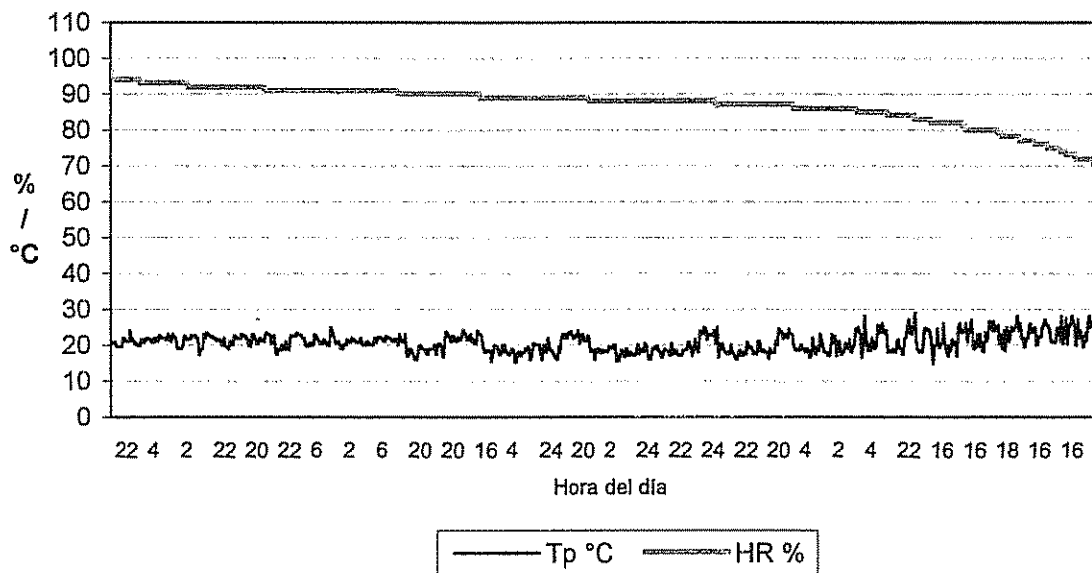


Fig. 11. Tendencia de la temperatura y la humedad relativa en el invernadero donde se ubicaron las plantas para la evaluación de la patogenicidad.

de la cámara, esta situación favoreció el desarrollo de la enfermedad, a pesar de existir lapsos en los que la temperatura fue bastante baja, ésta siempre estuvo muy por encima de la temperatura mínima citada por Porras y Pérez (1997).

Por efecto de las condiciones propias del sitio del estudio, la humedad relativa en el invernadero presentó valores bajos más bajos del mínimo aceptado (Porras y Pérez 1997) cerca del medio día durante todo el periodo de evaluación. Sin embargo, entre las seis de la tarde y las seis de la mañana de cada día, la HR se mantuvo arriba del 90 %. Esto último, sumado a la posible presencia de rocío sobre las hojas durante la noche y madrugada, propició el desarrollo de la enfermedad.

#### **4.5 Evaluación del desarrollo de la enfermedad**

Aquí es importante mencionar, que tal y como se informó en la metodología, el desarrollo de las lesiones causadas por *M. fijiensis* en plantas inoculadas artificialmente y puestas a crecer en cámara húmeda, muestran un desarrollo de la enfermedad diferente al que se observa en el campo. En este sentido, ya desde 1989, Galindo *et al*, realizando inoculaciones en invernadero encontraron que los síntomas conocidos como estrías, no simulan el progreso de la enfermedad que se observa en el campo, debido a que dichas estrías cambian directamente a manchas oscuras. Esto motivó a la medición de los siguientes parámetros.

##### **4.5.1 Periodos de incubación (PI), Transición (PT), Latencia (PL) y Necrosis Total (NT).**

En lo que concierne al periodo hasta Necrosis Total, a la fecha, sólo las cepas E#3, M6 #35, LF Roxana, PAIS 9 y Urania 19 presentaron tal estado de desarrollo de la enfermedad. Es por este motivo que exclusivamente se presentan los resultados para esas cepas.

En la Figura 12 se puede notar la respuesta obtenida sobre las hojas de banano (Gran Enano) a la inoculación con propágulos criocongelados de las 10 cepas de *M. fijiensis*



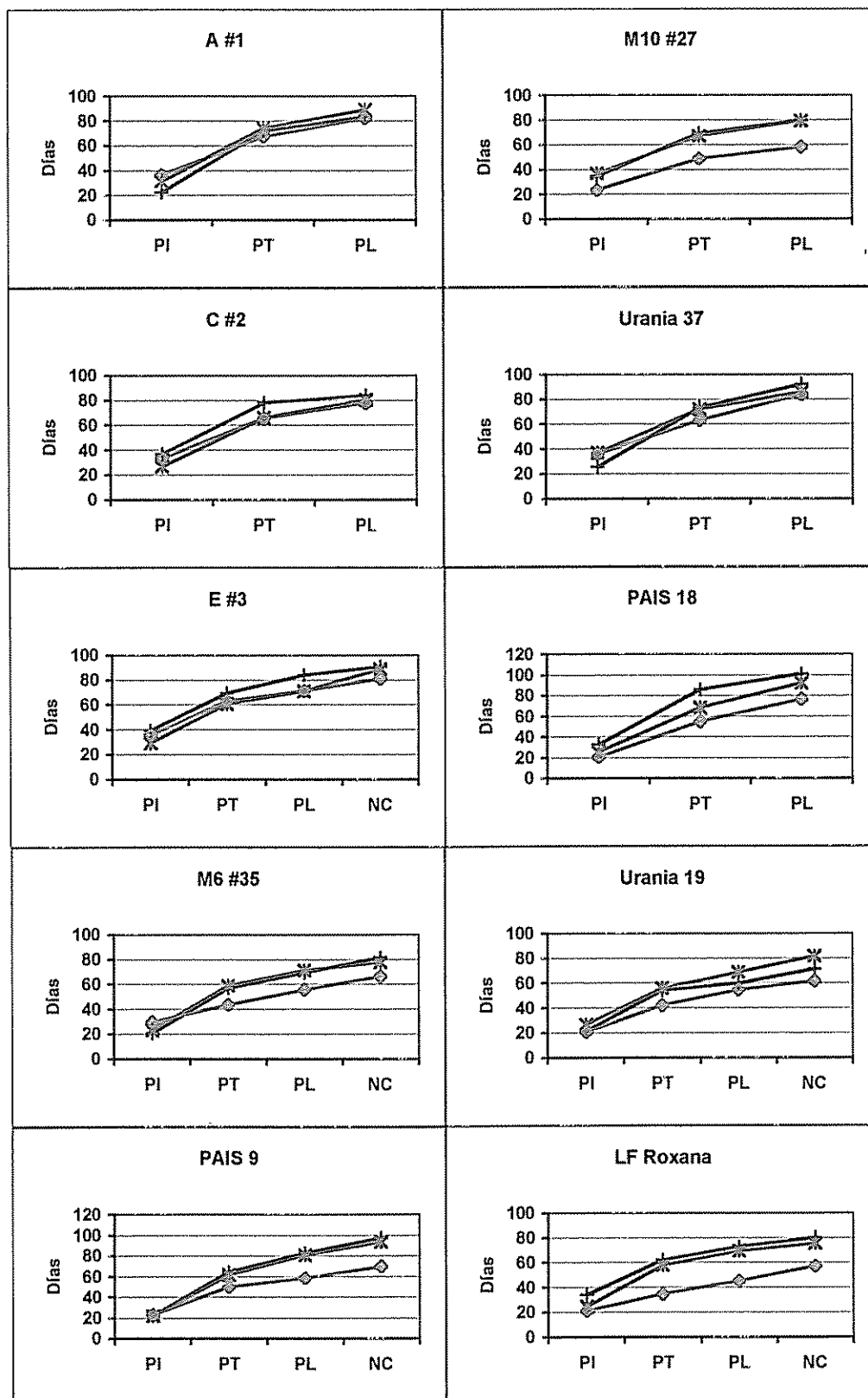


Fig. 12. Respuesta de 10 cepas de *M. fijiensis* criopreservadas (◆ +NL) o no (\* -NL y + Testigo) a la inoculación artificial sobre hojas de banana var. Gran Enano, evaluada por medio de cuatro periodos (PI= Periodo de Incubación, PT= Periodo de Transición, PL= Periodo de Latencia y NT= Necrosis Total).

estudiadas. Es destacable que la criocongelación en nitrógeno líquido (-196 °C) no afectó la capacidad de las cepas para infectar el hospedero.

El PI mostró variación entre 20,6 y 39,3 días, el PT entre 14,0 y 68,7 días y el PL entre 24,3 y 68,7 días para las 10 cepas estudiadas (Anexo 4.A). En tanto que el periodo a Necrosis Total varió entre 57,22 y 97,33 días (Anexo 5.A), en cinco cepas a las que fue posible medir esta variable, como se mencionó anteriormente.

La medición del PI reveló que en las cepas A#1, Urania 37 y PAIS 18 el testigo fue el que mostró los periodos más cortos de evolución. En el caso de las cepas C#2, E#3, M6 #35, LF Roxana y M10 #27 no hubo diferencia estadística entre los tratamientos +NL y -NL; siendo estos los que presentaron el periodo más corto de desarrollo (Anexo 6.A). El testigo no presentó diferencia con el tratamiento +NL en la cepa Urania 19 como los tratamientos que presentaron el periodo más corto y no hubo diferencia entre ninguno de los tratamientos en la cepa PAIS 9. Sin embargo, conforme avanzó la enfermedad, no hubo diferencia estadística entre la duración de los periodos de Transición y Latencia de las cepas criocongeladas y las no criocongeladas o fue menor a favor de las primeras.

Al identificar el tiempo requerido entre el PI y la aparición de las primeras 10 manchas en esta IV de infección (Periodo de Transición) se hizo evidente que el tratamiento +NL, en las cepas M6 #35, M10 #27, LF Roxana, PAIS 9 y PAIS 18, necesitaron de un menor número de días para culminar este periodo. No se apreciaron diferencias estadísticas entre los tratamientos para las cepas C#2, E3#, M10 #27, Urania 37 y Urania 19 (Anexo 7.A).

Siguiendo el desarrollo de la enfermedad, incluyendo a la cepa A#1, los tratamientos mostraron el mismo comportamiento para el PL que el mostrado en el PT. El tratamiento +NL continuó presentando los periodos más cortos de evolución, esta vez, para siete de las diez cepas, corroborado por el análisis estadístico (Anexo 8.A)

El análisis estadístico (Anexo 9.A) muestra que, para el periodo a Necrosis Total, no existe diferencias entre tratamientos para la cepa E#3. En el caso de la cepa Urania

19, el testigo y el tratamiento +NL no presentan diferencias estadísticas entre ellos pero sí con respecto al tratamiento -NL, el cual presentó el periodo más largo hasta necrosis. Para las cepas M6 #35, LF Roxana y PAIS 9 el tratamiento +NL mostró la más rápida evolución de la enfermedad y difiere del testigo y el tratamiento -NL.

Los resultados observados en la evaluación de patogenicidad de las cepas de *M. fijiensis* congeladas son comparables con los obtenidos por Holden y Smith (1992), quienes determinaron que urediniosporas de *Puccinia abrupta* almacenadas en nitrógeno líquido, a  $-196^{\circ}\text{C}$ , mostraron el más alto porcentaje de infección luego de su inoculación en plantas de *Parthenium hysterophorus*.

El comportamiento de los hongos criocongelados puede relacionarse con las observaciones que hacen Long *et al.* (1978) sobre el estado de madurez de los propágulos al momento de la congelación, lo que podría explicar la variación en la capacidad de invasión, pues, las estructuras jóvenes no soportarían el fuerte estrés al que son sometidas y sólo aquellas con un alto estado de madurez serían capaces de regenerarse; además de lo citado anteriormente por Aguilar *et al.* (1993), en el sentido de que la crioconservación desencadena un proceso de selección celular.

De ser así, sólo los conidios y fragmentos de micelio mejor capacitados tuvieron la capacidad de recuperarse satisfactoriamente luego de la descongelación. A su vez, dieron origen a estructuras reproductivas con mayor capacidad de explorar e invadir el tejido foliar del banano, en comparación con los organismos no congelados. De esta forma, el avance de la enfermedad pudo desarrollarse a mayor velocidad en los casos en que el inóculo fue previamente congelado en NL.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos y bajo las condiciones propias del presente estudio, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. El procedimiento ensayado para la crioconservación de cepas de *M. fijiensis* resultó ser sencillo, rápido y eficaz. La necesidad de equipo para congelar los hongos es básica, para lo cual es necesario sólo el tanque para contener el nitrógeno líquido y una buena supervisión del nivel de nitrógeno. Además, permitió mantener los organismos libres de contaminación y viables para las pruebas realizadas.
2. El cien por cien de las cepas sobrevivió al proceso de criocongelación. La recuperación, en función del área del medio de cultivo cubierta por el crecimiento del patógeno (invasión), varió entre 20 y 100 %.
3. Nueve de las diez cepas de *M. fijiensis*, criocongeladas en nitrógeno líquido a  $-196$  °C, fueron capaces de producir más de 150 000 conidios por mililitro. La cantidad de conidios obtenidos luego del periodo de congelación fue menor que las obtenidas en el testigo, en cada cepa.
5. Todas las cepas crioconservadas mostraron la capacidad de reproducir la enfermedad (Sigatoka negra). El desarrollo de la Sigatoka Negra, a partir de la inoculación con cepas criocongeladas en nitrógeno líquido a  $-196$  °C, se mantuvo igual o relativamente menor que el testigo en todas las cepas evaluadas.

## 5.2 Recomendaciones

1. Se recomienda el uso de la metodología de crioconservación para *M. fijiensis* descrita en esta investigación por el buen nivel de supervivencia del patógeno, medida en términos de recuperación y capacidad patogénica.
2. Es recomendable repetir este trabajo incluyendo diferentes periodos de cultivo del patógeno antes de ser congelado (diferentes edades), con el fin de medir si la edad tiene efecto sobre la supervivencia de las estructuras del patógeno almacenadas en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
3. Se sugiere ensayar el proceso de criocongelación descrito en este trabajo utilizando diferentes estructuras del patógeno en forma aislada (micelio, ascosporas, conidios).
4. Se deben realizar estudios comparativos que incluyan diferentes especies de patógenos, así como diferentes estructuras de reproducción cuando sea posible, para aumentar el alcance de esta técnica de crioconservación; debido a su facilidad de ejecución y economía con respecto a aquellas prácticas que necesitan trabajos de precongelmiento.
5. El uso de medios de cultivo líquidos debe ser considerado para futuros trabajos, pues, en pruebas preliminares simultáneas llevadas a cabo por el autor del presente trabajo, mostró ser un medio muy efectivo para la regeneración de los propágulos de *M. fijiensis*, después de la congelación en nitrógeno líquido.

## 6. LITERATURA CITADA

- Abdelnour-Esquivel, A; Escalant, JV.** 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, CR, CATIE.
- Abdelnour E, A** 1996. Papel de la crioconservación en la fitoprotección. *In* F Bertsch, W Badilla eds. Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales (10), Congreso Nacional de Fitopatología (3), Congreso Nacional de Suelos (2, 1996, San José, CR). ¿Puede la agricultura sostenible ser competitiva?. Memorias. San José, CR, EUNED/EUNA. v2. p 89-91.
- Aguilar, ME; Pérez, L; Salazar K.** 1999. Crioconservación de ápices del vástago de caoba (*Swietenia macrophylla*) cultivados *In Vitro* usando la técnica de encapsulación–deshidratación. *In* Actas de la IV semana científica (Turrialba, CR). “Logros de la investigación para el nuevo milenio”. Turrialba, CR, CATIE. 490 p (Serie técnica. Reuniones técnicas/CATIE, N° 5).
- Alexander, MP.** 1980. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain technology* 55(1):13-18.
- \_\_\_\_\_; **Engelman, F; Michaux-Ferrière, N.** 1993. Cryopreservation of cell suspensions of *Citrus deliciosa* Tan. and histological study. *Cryo-letters* 14:217-228.
- Belalcázar C, S; Merchán, VM.** 1991. Control de enfermedades. *In* SL Belalcázar C; JC Toro M; R Jaramillo C Eds. El cultivo del plátano en el trópico. Cali,CO, ICA. pp 241-297. (Manual de asistencia técnica. N° 50).
- \_\_\_\_\_; **Valencia, J; Arcila, MI.** 1998. Conservación y evaluación de la colección Colombiana de Musáceas. *In* MJ Grijaldo; SL Belalcázar; DG Cayón S; RG Botero I. Seminario internacional sobre producción de plátano. (1998, Armenia, CO). Armenia, CO, CORPOICA/Univ. del Quindío/SENA/Comité Departamental de Cafeteros del Quindío. ix, 313 p
- Berny, JF; Hennebert, GL.** 1991. Viability and stability of yeast cells and filamentous spores during freeze-drying. Effects of protectants and cooling rates. *Mycología* 83(6):808-815.
- Brand, JJ.** 2000. Cryopreservation of Cyanobacteria. University of Texas at Austin. <http://www.esb.utexas.edu/brand/index.html> 27/9/00 6:35 pm
- Burdsall Junior, HH; Dorworth, EB.** 1994. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia* 86(2):275-280.
- Carlier, J; Fouré, E; Gauhl, F; Jones, DR; Lepoivre, L; Mourichon, X; Pasberg-Gauhl, C; Romero, RA.** 1999. Fungal diseases of the foliage. *In* DR Jones Ed. Diseases of banana, abacá and enset. Worcestershire, UK, CABI. xv, 544 p.

- Chandler, D.** 1994. Cryopreservation of fungal spores using porous beads. *Mycological Research* 98(5):525-526
- CIRAD.** 1989. *Manual pratique d'histologie vegetale*. 61 p.
- CORBANA.** s.f. Procedimiento para obtener *in vitro* la fase asexual de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet), preparación del inóculo y técnicas para la inoculación de plantas en invernadero. *Sin publicar*.
- Cordeiro, ZJC; Matos P de, A; Silva de O e, S.** 1998. La Sigatoka negra en Brasil. *Infomusa (Esp)* 7(1):30-31.
- Croan, SC; Burdsall Junior, HH; Rentmeester, RM.** 1999. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes. *Mycologia* 91(5):908-916.
- Daniells, J; Davis, B; Peterson, R; Pegg, K.** 1995. Goldfinger: no tan resistente a la Sigatoka amarilla como se pensaba. *Infomusa (Esp)* 4(1):6.
- Dahmen, H; Staub, TH; Schwinn, FJ.** 1983. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology* 73(2):241-246.
- De Neergaard, E.** 1997. *Methods in botanical histopathology*. Institute of seed pathology for developing countries, DK.
- Dumet, D; Benson, EE.** 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. *In* Cryopreservation of tropical plant germplasm. (Tsukuba, JP). Current research progress and application. Eds F. Engelman and H Takagi. Rome, IT, JIRCAS/IPGRI. 496 p
- Ellis, JJ.** (1979). Preserving fungus strains in sterile water. *Mycologia* 71:1072-1075.
- Fouré, E.** 1985. Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladie des raies noires). (suite III). *Fruits* 40(6):393-399.
- \_\_\_\_\_. 1991. Les Cercosporioses des bananiers et des plantains au Cameroun, *Mycosphaerella fijiensis* et *M. musicola*. Amélioration des stratégies de lutte intégrée par des études épidémiologiques et la lutte génétique. In CS Gold; B Gremmill Eds. Biological and integrated control of highland banana and plantain pests and diseases. (1991, Cotonou, BJ). Proceedings. Ibadan, NG, IITA. x, 455 p.
- \_\_\_\_\_; **Moreau, A.** 1992. Contribution à l'étude épidémiologique de la Cercosporiose noire dans la zone bananière du Moundou au Cameroun de 1987 à 1989. *Fruits* 47(1):3-16.

- \_\_\_\_\_. 1994. Leaf spot diseases of banana and plantain caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijensis*. In DR Jones ed. The improvement and testing of *Musa*. A global partnership. Montpellier, FR, INIBAP. Proceedings. 37-46 p.
- Fujikawa, S; Jitsuyama, Y.** 2000. Ultrastructural aspects of freezing adaptation of cells by vitrification. In Cryopreservation of tropical plant germplasm. (Tsukuba, JP). Current research progress and application. Eds F. Engelman and H Takagi. Rome, IT, JIRCAS/IPGRI. 496 p
- Fullerton, RA; Stover, RH.** eds. 1990. Sigatoka leaf spot diseases of bananas. (1989, San José, CR). Proceedings. Montpellier, FR, INIBAP. vi, 374 p.
- \_\_\_\_\_; **Olsen, TL.** 1995. Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 23:39-48.
- Galindo, J; Vásquez, N; Tapia, AC.** 1989. Pprogress report on ultrastructural studies of the infection process of *Mycosphaerella fijensis* cultivars. In Sigatoka leaf spot diseases. (San José, CR). Workshop. INIBAP, Programa de mejoramiento de cultivos tropicales. 32 p.
- García, JA; Victores, R; Ricardo, H; Arrieta, G.** 1995. Alcances y limitaciones del cultivo de tejidos aplicado a la conservación de germoplasma. In Curso internacional sobre biotecnología vegetal y su aplicación a la conservación y uso de los recursos genéticos (Turrialba, CR). CATIE/FAO/IPGRI.
- García, L; Herrera, L; Bermúdez, I; Veitia, N; Clavero, J; Acosta M, C; Romero, C.** 1997. Metodología para la selección *in vitro* de *Mycosphaerella fijensis* Morelet en banano. Infomusa (Esp) 6(1):14-15.
- Gauhi, F.** 1992. Epidemiología y ecología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis*, Morelet) en plátano (*Musa sp*) en Costa Rica. Trad. J Espinosa. Panamá, PA, UPEB. 114 p.
- González, M.** 1999. Metodología para la manipulación y cultivo *in vitro* de *Mycosphaerella fijensis*. Manejo Integrado de Plagas. 53:i-iv.(Hoja técnica)
- Goos, RD; Davis, EE; Butterfield, W.** 1967. Effect of warming rates on the viability of frozen fungous spores. Mycologia 59:58-66.
- Holden, ANG; Smith, D.** 1992. Effects of cryopreservation methods in liquid nitrogen on viability of *Puccinia abrupta* var. *parthenicola* urediniospores. Mycological research 96(6):473-476
- Hwang, S; Kwolek, WF; Haynes, WC.** 1976. Investigation of ultralow temperature for fungal cultures III. Viability and grow rate mycelial cultures following cryogenic storage. Mycologia 68:377-387.

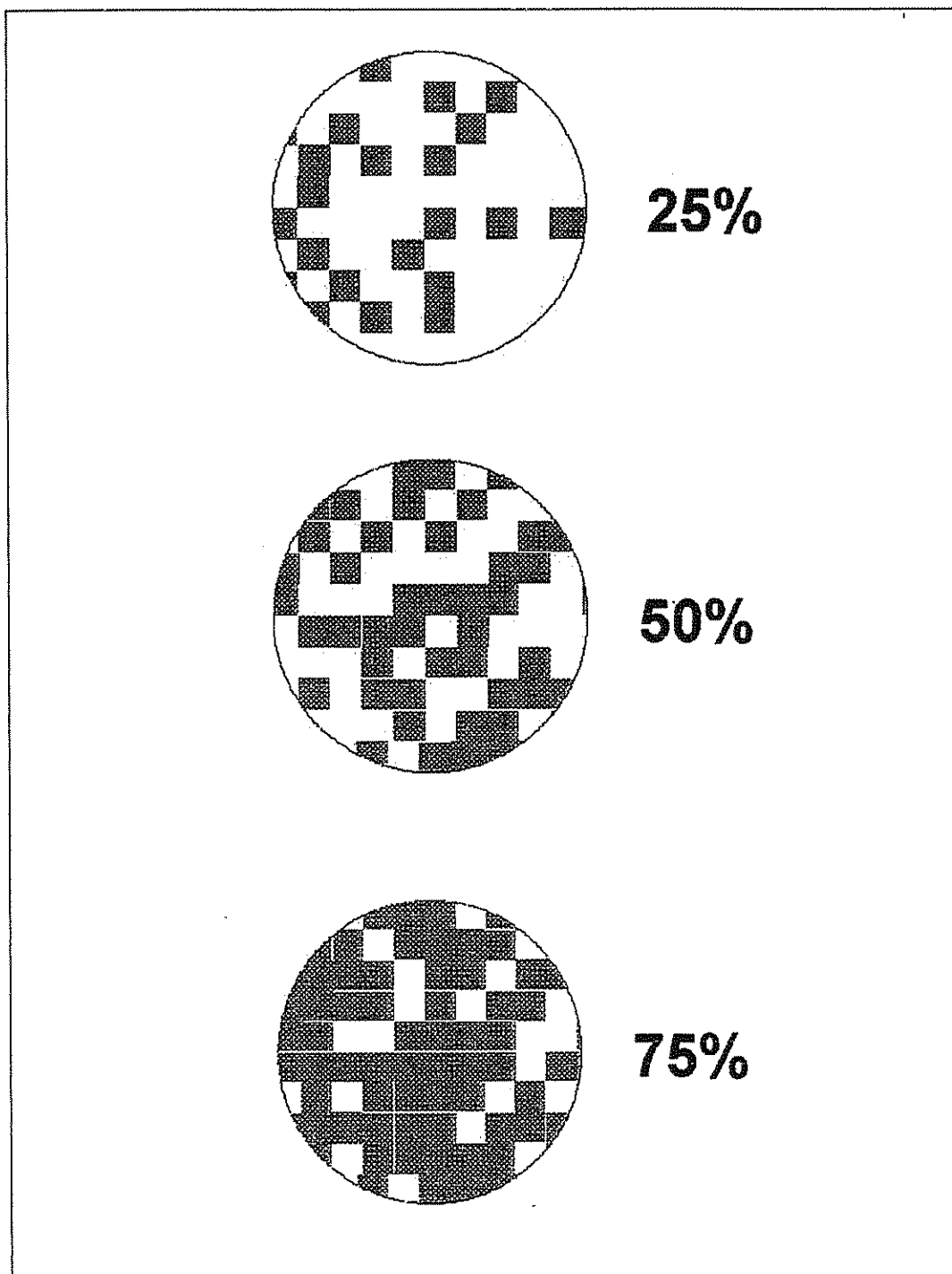


- Ingram, DS.** 1998. Plant pathogens, diversity and conservation. International congress of plant pathology (7, 1998, Edinburg, Scotland)
- Jacome, LH; Schuch, W; Stevenson, RE.** 1991. Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopathology* 81(12):1480-1485.
- Long, RA; Woods, JM; Schmitt, CG.** 1978. Recovery of viable conidia of *Sclerospora philippinensis*, *S. sacchari*, and *S. sorghi* after cryogenic storage. *Plant disease reporter*. 62(6):479-481.
- Marin V, D; Romero C, R.** 1992. El combate de la Sigatoka negra. In JA Sandoval; R Vargas V. Eds. 1998. La divulgación científica al servicio del productor bananero nacional. San José, CR, CORBANA. pp 104-129.
- Meredith, DS; Lawrence, JS.** 1969. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*). Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the british mycological society*. 52(3):459-476.
- Meryman, HT; Williams, RJ.** 1985. Basic principles of freezing injury to plant cells. Natural tolerance and approaches to cryopreservation. In Kartha, KK. ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Florida, USA, CRC Press. p 13-48.
- Mobambo, KN.** 1995. Factores que influyen sobre el desarrollo de la Sigatoka negra en el plátano y en los híbridos de plátano. *Infomusa (Esp)* 4(1):16-17.
- Mouliom P, A.** 1996. Enfermedades de Sigatoka del banano y plátano (*Mycosphaerella musicola* Leach and *M. Fijensis* Morelet). *Infomusa (Esp)* 5(1):8-9.
- Mourichon, X; Fullerton, RA.** 1990. Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*) respectively agents of Sigatoka disease and Black Leaf Streak Disease and Black Leaf Streak Disease in bananas and plantains. *Fruits* 45(3):213-218.
- \_\_\_\_\_. 1994. *Mycosphaerella fijiensis*. Diversity and possibilities for the early screening of germplasm for resistance. In DR Jones Ed. *Global conference of the international Musa testing program (1)*. (1994, Honduras). The improvement and testing of *Musa*. A global partnership. *Proceedings*. Montpellier, FR, INIBAP.
- Pereira, JCR; Batista, UG; Mizubuti, ESG; Guimarães, FB.** (1999). Sobrevivência e patogenicidade de fungos preservados em líquidos durante 12 anos. *Summa phytopathologica* 25:171-173.
- Pérez V, L.** 1998. Control de Sigatoka negra en Cuba. Un enfoque de manejo integrado de la enfermedad. *Infomusa* 7(1):26-30.
- Porras, A; Pérez, L.** 1997. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los tubos germinativos de las ascósporas de *Mycosphaerella* spp. Causantes de Sigatoka en banano. *Infomusa (Esp)* 6(2):27-31.

- Rhodes, PL.** 1964. A new banana disease in Fiji. Commonwealth phytopathological news. 10(3):38-41.
- Romero C, R; Sutton, TB.** 1997. Reaction of four *Musa* genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. Plant disease 81(10):1139-1142.
- Rodríguez M; Alvarez, JM; Ventura M, J de la C; López T, J; García G, M; Pino A; JA.** 1997. Estrategia para el mejoramiento del banano y el plátano en Cuba. Infomusa (Esp) 6(1):12-13.
- Serrano, E; Marín, DH.** 1998. Disminución de la productividad bananera en Costa Rica. CORBANA. 23(49):85-96.
- Singh, HP; Chadha, KL.** 1996. Bananos y plátanos en la India. Infomusa (Esp) 5(2):22-25.
- Smith, D.** 1982. Liquid nitrogen storage of fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 79(3): 415-421.
- Smith, D; Onions, AHS.** 1983. A comparison of some preservation techniques for fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 81(3):535-540.
- Smith, D; Onions, AHS.** 1994. The preservation and maintenance of living fungi. 2 ed. Egham, UK. Technical handbook N° 1
- Stalpers, JA; Hoog, A de; Vlug, IJ.** 1987. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. Mycología 79(1):82-89.
- Stover, RH.** 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. Plant disease 64(8):750-756.
- \_\_\_\_\_; **Simmonds, NW.** 1987. Bananas. 3 ed. UK, Longman. xv, 468 p. (Tropical agriculture series).
- Tan, CS; Stalpers, JA; van Ingen, CW.** 1991. Freeze-drying of fungal hyphae. Mycologia 83(5): 654-657.
- Tapia, AC.** 1993. Distribución altitudinal de la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*) y la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, CR, UCR. xiv, 76 p.
- Tooley, PW.** (1988). Use of uncontrolled freezing for liquid nitrogen storage of *Phytophthora* species. Plant disease 72(8):680-682.
- Yang, DQ; Rossignol, L.** 1998. Survival of wood-inhabiting fungi in liquid nitrogen storage. Mycologist 12(3):121-123.

## ANEXOS

1.A Tabla de referencia para determinar la invasión sobre el medio de cultivo de las cepas en los diferentes tratamientos (Testigo, -NL, +NL).



## 2.A Resultado del análisis estadístico para la esporulación de conidios

Cepa	F calculada	Pr > F	Tratamiento	Promedio	Duncan (0.05)
A #1	0.56	0.5998	Testigo	521666.7	a
			-NL	389666.7	a
			+NL	473333.3	a
C #2	1.05	0.4050	Testigo	468333.3	a
			-NL	480000.0	a
			+NL	381666.7	a
E #3	1.17	0.3716	Testigo	375000.0	a
			-NL	381666.7	a
			+NL	262333.3	a
LF Roxana	72.98	<.0001	Testigo	518333.3	a
			-NL	671666.7	a
			+NL	25333.3	b
M10 #27	1.81	0.2425	Testigo	403333.3	a
			-NL	488333.3	a
			+NL	370000.0	a
M6 #35	0.42	0.6773	Testigo	451666.7	a
			-NL	458333.3	a
			+NL	391666.7	a
PAIS 18	13.21	0.0063	Testigo	886666.7	a
			-NL	756666.7	a
			+NL	300333.3	b
PAIS 9	14.76	0.0048	Testigo	701666.7	a
			-NL	763333.3	a
			+NL	170666.7	b
Urania 19	1.16	0.3754	Testigo	246000.0	a
			-NL	295333.3	a
			+NL	164000.0	a
Urania 37	1.61	0.2750	Testigo	514333.3	a
			-NL	416666.7	a
			+NL	279333.3	a

**3.A Promedio de la esporulación conidial en las diferentes cepas de *M. fijiensis* sometidas a los tratamientos de crioconservación.**

Cepa	Trat.**	Conidios/ml (promedio)	Cepa	Trat.**	Conidios/ml (promedio)
A#1	Test	521666.7	LF Roxana	Test	518333.3
	-NL	389666.7		-NL	671666.7
	+NL	473333.3		+NL	25333.3
C#2	Test	468333.3	Urania 37	Test	514333.3
	-NL	480000.0		-NL	416666.7
	+NL	381666.7		+NL	279333.3
E#3	Test	375000.0	PAIS 9	Test	701666.7
	-NL	381666.7		-NL	763333.3
	+NL	262333.3		+NL	170666.7
M6#35	Test	451666.7	PAIS 18	Test	886666.7
	-NL	458333.3		-NL	756666.7
	+NL	391666.7		+NL	300333.3
M10#27	Test	403333.3	Urania 19	Test	246000.0
	-NL	488333.3		-NL	295333.3
	+NL	370000.0		+NL	164000.0

**4.A. Promedio para los periodos de Incubación (PI), Transición (PT) y Latencia (PL) representados en días durante la evolución de la Sigatoka negra utilizando cepas sometidas a los tratamientos de crioconservación (Testigo, -NL, +NL)**

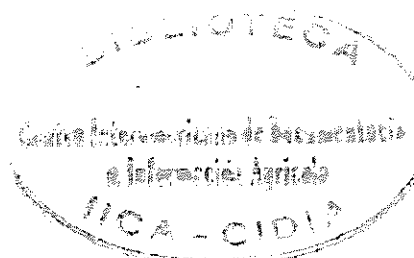
Cepa	Trat	PI	PT	PL
A#1	Test	22.6	49.3	60.8
	-NL	31.4	42.8	57.8
	+NL	36.5	30.8	45.8
C#2	Test	36.9	41.0	46.8
	-NL	26.6	39.4	53.9
	+NL	33.4	32.3	44.6
E#3	Test	39.3	30.3	44.4
	-NL	29.1	31.6	41.9
	+NL	35.7	27.4	35.4
M6#35	Test	20.8	36.4	48.8
	-NL	23.3	35.5	48.1
	+NL	29.7	14.0	26.2
M10#27	Test	34.8	34.3	44.9
	-NL	36.8	30.3	42.4
	+NL	23.6	25.1	34.7
LF Roxana	Test	34.1	28.1	38.6
	-NL	24.6	33.3	44.8
	+NL	20.9	13.8	24.3
Urania 37	Test	25.7	47.8	66.6
	-NL	36.8	35.2	49.2
	+NL	35.7	27.6	48.2
PAIS 9	Test	22.1	42.4	60.3
	-NL	21.7	39.8	59.1
	+NL	23.2	26.9	35.4
PAIS 18	Test	32.3	68.7	68.7
	-NL	25.3	42.9	49.5
	+NL	20.6	34.0	42.8
Urania 19	Test	21.4	32.8	38.2
	-NL	26.6	29.2	42.1
	+NL	20.6	21.4	34.0

**5.A Promedio para el periodo a Necrosis Total (NT) representado en días durante la evolución de la Sigatoka negra utilizando cepas sometidas a los tratamientos de crioconservación (Testigo, -NL, +NL)**

<b>Cepa</b>	<b>Trat</b>	<b>Necrosis Total</b>
E#3	Test	90.67
	-NL	88.83
	+NL	81.00
M6#35	Test	81.33
	-NL	77.67
	+NL	66.22
LF Roxana	Test	80.00
	-NL	75.50
	+NL	57.22
PAIS 9	Test	97.33
	-NL	93.61
	+NL	69.89
Urania 19	Test	71.33
	-NL	81.67
	+NL	61.89

## 6.A Resultado del análisis estadístico (SAS) para el Periodo de Incubación (PI)

Cepa	F calculada	Pr > F	Tratamiento	Promedio	Duncan (0.05)
A #1	3.74	0.0883	Testigo	22.6	a
			-NL	31.4	a
			+NL	36.5	a
C #2	6.85	0.0282	Testigo	36.9	a
			-NL	26.6	b
			+NL	33.4	ab
E #3	2.58	0.1557	Testigo	39.3	a
			-NL	29.1	a
			+NL	35.7	a
LF Roxana	40.74	0.0003	Testigo	34.1	a
			-NL	24.6	b
			+NL	20.9	c
M10 #27	21.71	0.0018	Testigo	34.8	a
			-NL	36.8	a
			+NL	23.6	b
M6 #35	1.82	0.2408	Testigo	20.8	a
			-NL	23.3	a
			+NL	29.7	a
PAIS 18	5.04	0.0519	Testigo	32.3	a
			-NL	25.3	ab
			+NL	20.6	b
PAIS 9	0.29	0.7592	Testigo	22.1	a
			-NL	21.7	a
			+NL	23.2	a
Urania 19	2.70	0.1461	Testigo	21.4	a
			-NL	26.6	a
			+NL	20.6	a
Urania 37	6.93	0.0276	Testigo	25.7	b
			-NL	36.8	a
			+NL	35.7	a





## 7.A Resultado del análisis estadístico (SAS) para el Periodo de Transición (PT)

Cepa	F calculada	Pr > F	Tratamiento	Promedio	Duncan (0.05)
A #1	4.76	0.0579	Testigo	49.3	a
			-NL	42.8	a
			+NL	30.8	a
C #2	2.41	0.1707	Testigo	41.0	a
			-NL	39.4	a
			+NL	32.3	a
E #3	0.13	0.8765	Testigo	30.3	a
			-NL	31.6	a
			+NL	27.4	a
LF Roxana	17.20	0.0033	Testigo	28.1	a
			-NL	33.3	a
			+NL	13.8	b
M10 #27	4.80	0.0564	Testigo	34.3	a
			-NL	30.3	ab
			+NL	25.1	b
M6 #35	5.45	0.0447	Testigo	36.4	a
			-NL	35.5	a
			+NL	14.0	b
PAIS 18	11.39	0.0091	Testigo	68.7	a
			-NL	42.9	b
			+NL	34.0	b
PAIS 9	11.62	0.0086	Testigo	42.4	a
			-NL	39.8	a
			+NL	26.9	b
Urania 19	2.25	0.1862	Testigo	32.8	a
			-NL	29.2	a
			+NL	21.4	a
Urania 37	2.16	0.1971	Testigo	47.8	a
			-NL	35.2	a
			+NL	27.6	a

## 8.A Resultado del análisis estadístico (SAS) para el Periodo de Latencia (PL)

Cepa	F calculada	Pr > F	Tratamiento	Promedio	Duncan (0.05)
A #1	7.10	0.0262	Testigo	60.8	a
			-NL	57.8	ab
			+NL	45.8	b
C #2	3.09	0.1197	Testigo	46.8	a
			-NL	53.9	a
			+NL	44.6	a
E #3	0.68	0.5413	Testigo	44.4	a
			-NL	41.9	a
			+NL	35.4	a
LF Roxana	21.76	0.0018	Testigo	38.6	a
			-NL	44.8	a
			+NL	24.3	b
M10 #27	25.21	0.0012	Testigo	44.9	a
			-NL	42.4	a
			+NL	34.7	b
M6 #35	8.31	0.0186	Testigo	48.8	a
			-NL	48.1	a
			+NL	26.2	b
PAIS 18	12.99	0.0066	Testigo	68.7	a
			-NL	49.5	b
			+NL	42.8	b
PAIS 9	23.51	0.0014	Testigo	60.3	a
			-NL	59.1	a
			+NL	35.4	b
Urania 19	1.12	0.3859	Testigo	38.2	a
			-NL	42.1	a
			+NL	34.0	a
Urania 37	1.38	0.3212	Testigo	66.6	a
			-NL	49.2	a
			+NL	48.2	a

**9.A Resultado del análisis estadístico (SAS) para el Periodo a Necrosis Total (NT).**

Cepa	F calculada	Pr > F	Tratamiento	Promedio	Duncan (0.05)
E #3	3.02	0.1240	Testigo	90.7	a
			-NL	88.8	a
			+NL	81.0	a
LF Roxana	43.52	0.0003	Testigo	80.0	a
			-NL	75.5	a
			+NL	57.2	b
M6 #35	5.24	0.0482	Testigo	81.3	a
			-NL	77.7	a
			+NL	66.2	a
PAIS 9	3.47	0.0999	Testigo	97.3	a
			-NL	93.6	a
			+NL	69.9	a
Urania 19	10.45	0.0111	Testigo	71.3	a
			-NL	81.7	a
			+NL	61.9	b