

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE POSGRADO

Selección *in vitro* e invernadero de clones de *Musa sp.* para la evaluación de su  
resistencia a la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, MORELET)

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico  
del programa de estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y  
Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de  
Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

*Magister Scientiae*

Por

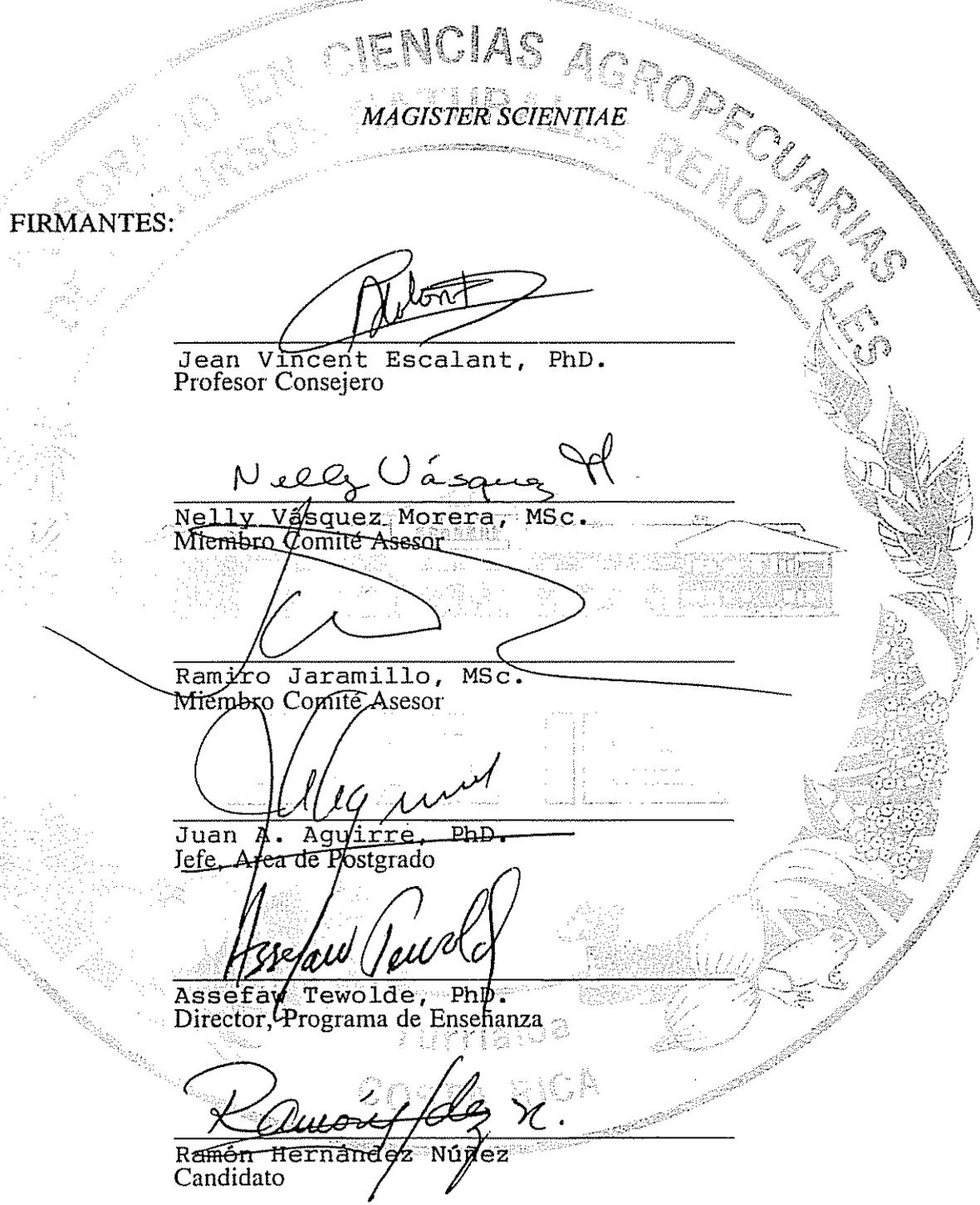
Ramón Hernández Núñez

CATIE

Turrialba, Costa Rica

1995

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:



FIRMANTES:

*Jean Vincent Escalant*

Jean Vincent Escalant, PhD.  
Profesor Consejero

*Nelly Vásquez Morera*

Nelly Vásquez Morera, MSc.  
Miembro Comité Asesor

*Ramiro Jaramillo*

Ramiro Jaramillo, MSc.  
Miembro Comité Asesor

*Juan A. Aguirre*

Juan A. Aguirre, PhD.  
Jefe, Area de Postgrado

*Assefaw Tewelde*

Assefaw Tewelde, PhD.  
Director, Programa de Enseñanza

*Ramón Hernández Núñez*

Ramón Hernández Núñez  
Candidato

## DEDICATORIA.

A MI PADRE RAMON HERNANDEZ por instruirme en este camino y darme las primeras lecciones.

A MI MADRE BIENVENIDA NUÑEZ.

A MIS HERMANOS: ROSA, RAUL, RICARDO Y ROBERTO.

A MI ABUELA LUISA NUÑEZ (fallecida), que con su sacrificio me mantuvo en este camino.

AL DR. ALBERTO BEALE, por su constante motivación y estímulo, para mí retorno al camino.

A MIS HIJOS: CARLOS Y LUISA, que con sus cosas de niño, mitigaron las penas de estos dos años.

A MI ESPOSA: MIOSOTIS, por soportarme y apoyarme en este difícil camino.

A LA M.Sc. NELLY VASQUEZ, por hacer de esta causa su propia causa, por su eterna buena voluntad.

## AGRADECIMIENTOS.

A MI DIOS TODO PODEROSO, por haberme acompañado durante estos dos años.

AL PUEBLO DE HOLANDA, por la ayuda económica brindada en la realización de mis estudios.

A mi profesor consejero, DR. JEAN VINCENT ESCALANT, por su atinadas sugerencias, valiosa colaboración y su constante preocupación en la realización de este trabajo.

A la M.Sc. ANA C. TAPIA, por su apoyo, colaboración y aportes a este trabajo.

Al M.Sc. PABLO ACUÑA CH. por su decidido apoyo, entusiasmo y su interés en el desarrollo del trabajo.

Al químico JAVIER VARGAS, por la importante ayuda ofrecida a este trabajo, por su trato afable.

Al técnico FRANKLIN LOPEZ T. por su amistad, por dedicar muchas horas extras gratis, a este trabajo.

A Carlitos Aguirre por los ratos amenos.

Al DR. PEDRO OÑORO, que sin ser miembro del comité de tesis, se interesó siempre por mi trabajo, haciéndole invaluable aportes.

Al M.Sc. RAMIRO JARAMILLO, por la valiosa contribución a este trabajo, por su gran sensibilidad humana.

A la M.Sc. NELLY VASQUEZ, por sus enseñanzas, estímulos para seguir adelante, por su dedicación y colaboración en la realización de este trabajo.

A KENNETH, por su ayuda y buen deseo de cooperación.

A MANRIQUE GONZALEZ.

A TODO EL PERSONAL DE BIOTECNOLOGIA, Maritza, Juan Carlos, Edgar, Luis, Juan Luis, Olman, William, Rafael, Alexis, Carlos Astorga, por brindarme su colaboración y amistad.

A la familia PAIZ-ROSALES, por su valiosa amistad durante estos dos años, la que siempre recordaré.

A la familia NAVIA-ESTRADA, por su sincera amistad.

A mi compañeros de estudio: Carolina Soihet, Jorge Blanco.

Sinceramente gracias.

## INDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE.....	v
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ANEXOS.....	xvi
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1. Sistemática del género <i>Musa</i> .....	5
2.2. Características de la enfermedad Sigatoka negra:( <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ).....	6
2.2.1. Biología del hongo causante de la Sigatoka negra.....	8
2.4. Susceptibilidad de cultivares de <i>Musa sp.</i> .....	10
2.5. Programas de mejoramiento genético.....	12
2.6. Interacción hospedante-patógeno.....	16
2.6.1. Resistencia de las plantas al ataque de patógeno.....	16
2.6.2. Mecanismos de defensas de las plantas al ataque de patógenos.....	18
2.6.3. Selección de materiales sometidos a toxinas del patógeno (patotoxinas).....	22
III. MATERIALES Y METODOS.....	26
3.1. Localización del área experimental.....	26
3.2. Material experimental.....	26
3.2.1. Material vegetal.....	26
3.2.2. Aislamientos del hongo.....	27
3.3. Inoculación de vitroplantas utilizando conidios.....	27
3.3.1. Evaluación de los síntomas.....	28

3.4.	Evaluación de la actividad biológica del extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> .....	30
3.4.1.	Obtención del inóculo del hongo.....	30
3.4.2.	Obtención del extracto crudo del hongo.....	30
3.4.3.	Pruebas biológicas preliminares usando el extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> sobre hojas de vitroplantas...	31
3.4.5.	Inoculación del extracto sobre hojas de vitroplantas de <i>Musa sp.</i> en incubadora con alternancia de luz.....	33
3.4.6.	Evaluación del efecto del extracto.....	34
3.5.	Evaluación <i>in vitro</i> de clones de <i>Musa sp.</i> por su resistencia al extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> .....	36
3.5.1.	Preparación de los materiales de siembra <i>in vitro</i> y su cultivo.....	36
3.5.2.	Evaluación.....	37
3.5.3.	Evaluación histológica de las pruebas de inoculación.....	39
3.6.	Estudio histológico.....	39
3.6.1.	Inclusión para corte en parafina.....	39
3.6.2.	Procesamiento de muestra para para observar fenoles.....	40
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
4.1.	Inoculación de vitroplantas utilizando conidios..	41
4.2.	Análisis histológico de las hojas inoculadas con conidios.....	44
4.3.	Evaluación de la actividad biológica o tóxica del extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> .....	46
4.3.1.	Obtención del inóculo del hongo y crecimiento en medio líquido.....	46

4.3.2. Obtención del extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> .....	46
4.3.3. Pruebas preliminares usando el extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> sobre hojas de vitroplantas.....	48
4.3.4. Evaluación del extracto crudo sobre hojas de <i>Musa sp.</i> en incubadora con alternancia de luz.....	50
4.3.5. Efecto macroscópico del extracto crudo sobre las hojas de seis materiales de <i>Musa</i> .....	58
4.3.6. Análisis histológico del efecto de las inoculaciones del extracto crudo sobre hojas.....	61
4.4. Evaluación de resistencia <i>in vitro</i> utilizando el extracto crudo de <i>M.</i> <i>fijiensis</i> sobre callos de <i>Musa sp.</i> .....	73
4.4.1. Obtención del material <i>in vitro</i> para la prueba evaluación.....	73
4.4.2. Prueba de evaluación de resistencia <i>in vitro</i> utilizando callos de <i>Musa sp.</i> ....	73
4.5. Análisis histológico de la reacción de los callos de "Gran Enano" y "Calcuta 4".....	77
V. CONCLUSIONES.....	81
VI. RECOMENDACIONES.....	83
LITERATURA CITADA.....	84
ANEXOS.....	97

HERNANDEZ N., R. 1995. Selección *in vitro* e invernadero de materiales de *Musa sp.* para la evaluación de su resistencia a Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, MORELET). Tesis M.Sc., Turrialba, CATIE.

**PALABRAS CLAVES:** *Musa sp.*, *M. fijiensis*, Sigatoka negra, extracto crudo, conidios, inoculación, medio M-1-D, compuestos fenólicos "Gran Enano", "Calcuta 4", "Curraré", "Embrapa-403", "Saba", "Yangambí" vitroplantas, área de lesión, susceptibilidad, resistencia.

### RESUMEN

Se planteó establecer una metodología para la obtención del extracto crudo de *Mycosphaerella fijiensis* y probar su efecto biológico sobre hojas de vitroplantas en invernadero así como sobre cultivos *in vitro* de *Musa sp.* con diferente grado de resistencia a la enfermedad.

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de fitopatología, ganadería y biotecnología del CATIE. Se utilizaron ocho cultivos monospóricos del hongo, los materiales vegetales evaluados fueron: "Gran Enano", "Calcuta 4", "Curraré", "Embrapa-403", "Saba", y "Yangambí". Los trabajos se iniciaron inoculando conidios sobre las hojas de "Gran Enano" y "Calcuta 4". Se comprobó el grado de resistencia diferencial entre los materiales y la virulencia de las cepas utilizadas.

Mediante la inoculación del medio M-1-D, con colonias de *M. fijiensis* y la aplicación de la metodología descrita se obtuvo el extracto crudo.

La aplicación de 20 µl de la dilución del extracto crudo en carbonato de sodio al 0.5% y fosfato monobásico 0.1M provocó el desarrollo de lesión sobre hojas en todos los cultivares. Sin embargo la evaluación a las 24, 48, 72 y 96 horas permitió observar diferencias entre los materiales de varios grados de resistencia.

Al usar 60 µl del extracto crudo, diluido en carbonato de sodio al 0.5% y fosfato monobásico 0.1 M, se observó reacción de necrosis de las células más externas que conforman el callo de "Gran Enano" 72 horas después de la inoculación del medio, este daño fue en aumento al usar dosis mas altas. A diferencia, el uso de concentraciones de extracto crudo igualmente altas no provocaron reacción en los callos de "Calcuta 4", el cual presenta resistencia a la enfermedad.

El análisis histológico del tejido foliar inoculado con conidios mostró que la mayor acumulación de compuestos fenólicos se localizó a nivel de células oclusivas en el clon "Calcuta 4" y en células epidérmicas vecinas en el cultivar "Gran Enano". Esto podría explicar parcialmente el comportamiento de los materiales a *M. fijiensis*.

En el análisis histológico de los tejidos foliares de los seis materiales inoculados con extracto crudo, los cultivares "Gran Enano y "Curraré" presentaron los mayores niveles de fenoles a las 96 horas después de la inoculación, seguidos por los materiales "Yangambi" y "Calcuta 4", donde se observó un aumento en la acumulación de fenoles con el tiempo. Los materiales "Saba" y "Embrapa-403", mostraron bajo contenido de fenoles.

El uso del extracto crudo de *M. fijiensis* permite de manera rápida y eficaz (48 horas en pruebas de invernadero y 72 horas en cultivos de callos) identificar el grado de resistencia a la enfermedad de los materiales de Musa así tratados; lo que representa un significativo ahorro en tiempo y recursos si pensamos hacer estas pruebas en campo utilizando el patógeno

HERNANDEZ N., R. 1995. In vitro and greenhouse selection of *Musa sp.* material to evaluate its resistance to Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* MORELET). M.Sc. Thesis, CATIE, Turrialba.

KEY WORDS: *Musa sp.*, *M. fijiensis*, Black Sigatoka, crude extract, conidia, inoculation, M-1-D medium, phenolic compounds, "Gran Nain", "Calcutta 4", "Curraré", "Embrapa-403", "Saba", "Yangambi" vitroplants, lesion area, susceptibility, resistance.

#### SUMMARY

A methodology to obtain raw *Mycosphaerella fijiensis* extract to test its biological effect on vitroplant leaves in the greenhouse as well as on in vitro *Musa sp.* plants with different degrees of resistance was established.

Research was conducted at CATIE's plant pathology, animal husbandry and biotechnology laboratories. Eight monospore cultures of the fungus were used, and vegetative materials tested were "Gran Nain", "Calcutta 4", "Curraré", "Embrapa-403", "Saba", and "Yangambi". "Gran Nain" and "Calcutta 4" leaves were inoculated with conidia. The degree of differential resistance between the materials and virulence of the strains used was tested.

Crude extract was obtained by inoculating the M-1-D medium with *M. fijiensis* colonies using the methodology described.

The application of 20µl of the crude extract dilution in 0.5% sodium carbonate and 0.1M monobasic phosphate caused the development of leaf lesions in all of the cultivars. However, evaluations at 24, 48, 72 and 96 hours showed differences in degrees of resistance among the materials.

When 60  $\mu$ l of the crude extract, diluted in 0.5% sodium carbonate and 0.1 M monobasic phosphate was used, necrosis was observed in the most external cells of the "Gran Nain" callous. Seventy-two hours after the medium was inoculated, the damage observed was directly proportional to the level of inoculum. On the other hand, the use of equally high concentrations of the crude extract did not cause reactions in the calluses of "Calcutta 4", which is resistant to the disease.

Histological analysis of leaf tissue inoculated with conidia showed that the greatest accumulation of phenolitical compounds was localized at the underlying cell level in the "Calcutta 4" clone and in neighboring epidermical cells in the "Gran Nain" cultivar. This could partially explain the behavior of the materials to *M. fijiensis*.

In the histological analysis of leaf tissues from the six materials inoculated with crude extract, the "Gran Nain" and "Curraré" cultivars showed the highest levels of phenols 96 hours after inoculation, followed by "Yangambi" and "Calcutta 4", where an increase in the accumulation of phenols over time was observed. "Saba" and "Embrapa-403" showed low phenol contents.

The use of crude *M. fijiensis* extract allows a rapid and efficient (48 hours in greenhouse and 72 hours in callus crops) identification of the degree of resistance to the disease of Musa materials treated; which represents a significant time and resource savings if these tests are carried in the field using the pathogen.

## LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1.	Materiales de <i>Musa sp.</i> utilizados en las diferentes investigaciones.....	27
Cuadro 2.	Promedio de las variables epidemiológicas evaluadas sobre vitroplantas de <i>Musa sp.</i> en invernadero, utilizando conidios de <i>M. fijiensis</i> .....	43
Cuadro 3.	Total de área foliar necrosada hasta las 96 horas, de seis materiales de <i>Musa sp.</i> inoculadas con el extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> .....	51
Cuadro 4.	Promedio del desarrollo de lesión en seis materiales de <i>Musa sp.</i> durante diferentes períodos de evaluación.....	53
Cuadro 5.	Promedio del tamaño de las lesiones (mm <sup>2</sup> ) en hojas de seis materiales de <i>Musa sp.</i> evaluados en cuatro períodos.....	56
Cuadro 6.	Análisis de varianza de las lecturas del tamaño de las lesiones en hojas de seis materiales de <i>Musa sp.</i> evaluadas en dos pruebas de inoculación utilizando diferentes extractos.....	58
Cuadro 7.	Caracterización del extracto crudo en hojas de seis materiales de <i>Musa sp.</i> evaluados en cuatro periodo de tiempo.....	59
Cuadro 8.	Acumulación de compuestos fenólicos de las áreas foliares inoculadas con el extracto crudo durante el período de evaluación.....	75
Cuadro 9.	Respuesta de los callos de "Gran Enano" y "Calcuta 4" a la inoculación del extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> .....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Morfología de la estructura reproductiva asexual de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ( <i>Cercospora fijiensis</i> ).....9	9
Figura 2.	Cámara para la evaluación biológica del extracto crudo <i>M. fijiensis</i> .....35	35
Figura 3.	Depósito de fenoles en células oclusivas del clon "Calcuta 4" 24 días después de la inoculación.....42	42
Figura 4.	Desarrollo de espermogonios y conidióforos en el cultivar "Gran Enano", 50 días después de inoculación.....42	42
Figura 5.	Total de área foliar necrosada hasta las 96 horas después de la inoculación con el extracto de <i>M. fijiensis</i> .....52	52
Figura 6.	Desarrollo de las lesiones en seis materiales de <i>Musa sp.</i> a las 24, 48, 72 y 96 horas de la inoculación.....52	52
Figura 7.	Promedio del tamaño de las lesiones (mm <sup>2</sup> ) de hojas se seis materiales de <i>Musa sp.</i> evaluados a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la inoculación.....55	55
Figura 8.	Promedio del desarrollo de la lesión en seis materiales de <i>Musa sp.</i> a las 24, 48, 72 y 96 horas, después de la inoculación Análisis combinados.....57	57
Figura 9.	Promedio del tamaño de las lesiones (mm <sup>2</sup> ) de hojas de seis materiales de <i>Musa sp.</i> evaluados a las 24, 48, 72 y 96 horas. Análisis combinado.....57	57
Figura 10.	Desarrollo de lesiones en hojas de seis Materiales de <i>Musa sp.</i> inoculadas con el extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> .....60	60

Figura 11.	Depósito de fenoles en los clones "Gran Enano" 4x(A) y "Curraré" 4x(B) a las 96 horas después de la inoculación.....	62
Figura 12.	Depósito de fenoles en los clones "Calcuta 4" a 4x(A) y "Yangambi" 4x(B) a las 96 horas después de la inoculación.....	63
Figura 13.	Depósito de fenoles en los clones "Saba" 4x(A) y "Bras-403" 4x(B) a las 96 horas después de la inoculación.....	64
Figura 14.	Depósito de fenoles de color rojo sobre la superficie adaxial del clon "Saba". ...	66
Figura 15.	Depósito de fenoles en el clon "Bras-403", 48(A) y 96(B) horas después de la inoculación.....	66
Figura 15.	Detalle de los fenoles (F) producidos por los cultivares "Gran Enano" (A), "Curraré" (B), "Calcuta 4" (C), "Yangambi" (D), "Saba" (E) y "Bras-403" (F).10X.....	67
Figura 16.	Sección transversal de la hoja de los clones "Gran Enano" (A) "Curraré" (B) "Yangambi" (C) y "Calcuta 4".....	70
Figura 17.	Sección transversal de hojas de "Gran Enano" (A) y "Curraré" (B).....	72
Figura 18.	Sección transversal de hojas de "Gran Enano" (C), y "Curraré" (D), con tejido macerado por inoculación con extracto crudo.....	72
Figura 19.	Reacción de callos de "Gran Enano" y "Calcuta 4" a la presencia de extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> , 14 días después de la inoculación.....	74

Figura 20.	Sección transversal de callos de "Gran Enano" inoculados con 100 $\mu$ l(A) y 300 $\mu$ l(B) de extracto crudo de <i>M. fijiensis</i> .....	79
Figura 21.	Sección transversal de callos de "Gran Enano" y "Calcuta 4". Respuestas al extracto crudo. (A), "Gran Enano", testigo 4x; (B), "Calcuta 4" 100 $\mu$ l del extracto 10x; (C), "Calcuta 4" 300 $\mu$ l 4x; (D), "Gran Enano" 60 $\mu$ l, 4x; (E), "Gran Enano" 100 $\mu$ l, 4x (f), "Gran Enano" 300 $\mu$ l 4x.....	80

## LISTA DE ANEXOS.

Anexo 1 A.	Medio de cultivo M-1-D modificado para la producción de toxinas del hongo <i>M. fijiensis</i> ...	97
Anexo 2 A.	Representación esquemática de una semilla y de un embrión de <i>Musa</i> .....	98
Anexo 3 A.	Medios empleados para la evaluación <i>in vitro</i> de la resistencia al extracto crudo en callos de <i>Musa</i> .....	99
Anexo 4 A.	Cámara de 24 pozos en los cuales se colocaron los callos conteniendo los diferentes tratamientos.....	100
Anexo 5 A.	Preparación de cortes histológicos.....	101
Anexo 6 A.	Análisis de varianza para el período de incubación de vitroplantas inoculadas con conidios de <i>C. fijiensis</i> .....	105
Anexo 7 A.	Promedio del tamaño de las lesiones (mm <sup>2</sup> ) en dos hojas de seis materiales de <i>Musa sp.</i> inoculadas con agua (carbonato de sodio al 0.5% y fosfato monobásico 0.1 M.)....	105
Anexo 8 A.	Promedio del tamaño de las lesiones (mm <sup>2</sup> ) en dos hojas de seis materiales de <i>Musa sp.</i> inoculadas con el extracto testigo del medio M-1-D.....	106
Anexo 9 A.	Análisis de varianza de las lecturas del área de lesiones en dos hojas de seis clones de <i>Musa sp.</i> Segunda evaluación de inoculación.....	106
Anexo 10 A.	Respuesta de los callos de "Gran Enano" y "Calcuta 4" a la inoculación del extracto de <i>M. fijiensis</i> .....	107

## I. INTRODUCCION

El cultivo del plátano y el banano en los trópicos tiene una especial importancia, no solo por constituir un alimento esencial en la dieta básica de sus habitantes, donde se les considera como las fuentes energéticas alimentarias más baratas y disponibles para las personas de menores recursos, sino en virtud del volumen de mano de obra que genera, los ingresos que de ellos se obtienen y porque una parte de su producción se destina a la exportación (Ochse *et al.* 1985).

La producción mundial promedio de plátano y banano en 1992 fue de 76 millones 500 mil toneladas métricas. De este total, se produjeron 9 millones de toneladas métrica en Centroamérica y el Caribe. De este último valor, Costa Rica representa el 21% de la producción total de banano y la República Dominicana el 51% de la producción de plátano. Sin embargo estas cifras no reflejan el gran volumen de fruta que consumen millones de pequeños agricultores que cultivan sus propias plantas, ni la que se vende en los mercados locales de pequeños poblados de la región y de todo el resto del trópico (FAO, 1992)

Recientemente, ha aumentado la preocupación de dar un enfoque de mayor alcance al mejoramiento de Musa, debido principalmente a la presencia en América Central (1972), Africa (1973) y Colombia (1981), de la enfermedad conocida como Sigatoka negra o raya negra de la hoja, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Esta enfermedad causa una defoliación severa, la cual disminuye el rendimiento en más del 50%, al ocasionar una baja producción de frutas, lo cual hace que el cultivo no sea rentable.

El control de la enfermedad se efectúa básicamente con productos químicos (fungicidas), no obstante el hongo va adquiriendo resistencia a tales productos; además de las implicaciones ecológicas y/o toxicológicas que ocasionan dichos productos en el medio ambiente.

Es por estas razones que los diferentes programas de mejoramiento genético, se desarrollaron con el propósito de obtener cultivares resistentes a esta enfermedad. Sin embargo las variedades comerciales comestibles son triploides, con frutos partenocárpicos y semilla sexual estéril; condiciones que reducen la variabilidad genética y la posibilidad de hacer hibridaciones, haciendo difícil aplicar los métodos convencionales de mejoramiento a estas especies (Krikorian y Cronauer, 1984).

Actualmente el cultivo *in vitro* de células vegetales y su rediferenciación hasta plantas completas, aportan nuevas posibilidades experimentales complementarias a los programas convencionales de mejoramiento en plátano y banano, mediante la producción de plantas haploides, variantes somaclonales, suspensiones celulares y fusión de protoplastos, asociados con técnicas tradicionales de hibridación con diploides o aplicados directamente. También es posible el uso de la ingeniería genética mediante la transformación directa (Escalant y Teisson 1989; Murfett y Clarke 1987).

En el caso del control de enfermedades, una estrategia que puede producir organismos resistentes a algunas de las muchas enfermedades causadas por hongos y bacterias que atacan a las plantas, es seleccionar líneas resistentes a las toxinas producidas por el parásito (Robert y Loyola 1985), lo que podría lograrse exponiendo callos o suspensiones celulares (por ser posible fuentes de variación *in vitro*), a toxinas del patógeno.

El uso de toxinas como agentes de selección *in vitro* de materiales resistentes a una enfermedad, tiene su origen en el trabajo de Carlson (1973), quien obtuvo mediante la selección de líneas resistentes a la metionina sulfoximina, plantas de tabaco resistentes a la infección por *Pseudomonas tabaci*.

Behnke (1979), empleó filtrados de cultivo de *Phytophthora infestans* para seleccionar callos de papas resistentes, de los que obtuvo plantas tolerantes. Gengenbach *et al* (1977), obtuvieron plantas de maiz resistentes a *Helminthosporium*, empleando la toxina T del hongo como presión de selección.

La utilización de presión de selección a nivel del cultivo de callo o suspensión celular, permite también una selección de los callos y células de forma rápida y temprana evitando sembrar en el campo grandes poblaciones heterogéneas de plantas, para identificar dentro de esas poblaciones aquellas que presenten alguna resistencia o tolerancia al patógeno (Escalant, Tapia y Sandobal 1991).

El propósito del presente trabajo, es el de establecer una metodología para la obtención del extracto crudo de *M. fijiensis* y probar su efecto biológico sobre hojas de plantas en invernadero, así como sobre materiales *in vitro* de *Musa* sp. con diferente grado de resistencia a la enfermedad. Para tal fin se propusieron los siguientes objetivos:

### Objetivo General

Obtener un método de selección (tanto *in vitro* como en invernadero), eficaz y rápido que permita identificar plantas que presenten alguna resistencia a *M. fijiensis*

### Objetivos Específicos.

1. Desarrollar un método de obtención del extracto crudo del hongo *M. fijiensis*.
2. Probar en invernadero la inoculación de *M. fijiensis* utilizando conidios y extracto crudo sobre plantas y hojas de *Musa* sp., con el fin de identificar el grado de resistencia de algunos clones.
3. Evaluar *in vitro*, concentraciones del extracto crudo sobre callos de *Musa* sp., hasta determinar la dosis mínima efectiva que permita identificar el grado de resistencia, en forma rápida y efectiva.
4. Observar mediante estudios histológicos el grado y tipo de reacción de los tejidos foliares inoculados con conidios y extracto crudo, así como de los cultivos de callos sometidos a presión de selección a través del extracto crudo del *M. fijiensis*.

La hipótesis que se planteó fue:

Existe un método de selección *in vitro* y/o en invernadero eficaz y rápido que permite la identificación del grado de resistencia de clones de *Musa* sp. a *M. fijiensis*.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Sistemática del género *Musa*.

Este género es estrictamente tropical, pertenece a la familia de las *Musáceae*, dentro del orden *Zingiberales*, en la clase de las *Monocotiledóneas*. Comprende hierbas altas perennes, con base foliares unidas entre ellas, formando unseudotallo. Poseen además una lámina foliar grande, con nervadura central muy desarrollada y la secundaria pinnada-estriada (Flores, 1989). La inflorescencia posee brácteas vistosas con flores irregulares y unisexuales; las pistiladas presentan un ovario de tres celdas; las estaminadas tienen seis estambres fértiles y un estaminodio. El fruto es una baya (León 1987).

El género *Musa* está constituido por cuatro secciones o series: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa* (Simmonds 1962).

La sección *Eumusa* es la de mayor interés económico que incluye la mayor parte de los cultivares conocidos de banano y plátano, los cuales basicamente son producto de la hibridación entre dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla. Simmonds y Shepherd (1986), designaron con las letras "A" a los derivados de *acuminata* y "B" a los derivados de *balbisiana*, para llegar a una clasificación resumida de los bananos. Así los cultivares diploides son AA, BB y AB, los triploides AAA, AAB y ABB y los tetraploides posibles se enmarcan entre AAAA AAAB y AB BB (Rowe, 1985; Shepherd, Dantas y Alves 1986).

Los cultivares diploides juegan un papel importante en los programas de mejoramiento, debido a que presentan variabilidad en cuanto al porte, número y desarrollo de hijos, número de manos por racimo y tamaño de frutos. En lo referente a las enfermedades se han identificado, también fuentes de resistencia a las cuatro razas de la marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. *cubense*), a la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*), a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y al nemátodo barrenador (*Radopholus similis*) (Rowe y Richardson, 1975).

Los cultivares tetraploides son relativamente raros y poco cultivados en todo el mundo. Sin embargo, pueden producirse mediante polinizaciones controladas de determinados cultivares triploides (Shepherd, 1986)

## 2.2. Características de la enfermedad Sigatoka negra: (*M. fijiensis*).

La Sigatoka negra, es causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, y es el principal problema fitosanitario de los cultivos de banano y plátano en América Central, parte de América del Sur y en muchas regiones de Asia y Africa.

Se describió como una nueva enfermedad en 1963 en Fiji y denominada como "raya negra de la hoja" debido a la apariencia oscura producida por la abundancia de manchas sobre las hojas. (Rhodes 1964, Jones 1990). Rapidamente se diseminó a través de las islas Fiji en 1964, desplazando a la Sigatoka amarilla (*M. musicola*), como mancha foliar (Meredith 1970).

En 1970, la nueva enfermedad se encontraba presente en todas las islas del Pacífico del Sureste Asiático (Meredith 1970), Singapur, Indonesia, Tailandia y Malasia (Reddy 1969).

La progresión de esta enfermedad en Africa desde 1973 causó grandes pérdidas. Reportada por primera vez en Gabón en 1979 (Frossard 1980), llegó a Camerún y Congo en los años 1985-86 (Mourichon 1986), y está presente en la actualidad en toda Africa Occidental. Reportada en Africa del Este hace poco, está desplazando la Sigatoka amarilla hacia zonas de altura superior a los 900 metros (Fouré y Lescot, 1988),

En Centro América la enfermedad fue observada por primera vez, en el valle de Ulúa en Honduras, en 1972, por Stover y Dickson (1976). llegando a la región de San Carlos Costa Rica en 1979 (Stover 1980). Está actualmente en toda América Central. En esta región, según Marín y Romero (1992), esta enfermedad ocasionó un aumento de US\$ 600 a 800/ha/año en los costos de producción del banano en el año 1991.

En América del Sur, la enfermedad de la Sigatoka negra se reportó por primera vez en Colombia en 1981, y está actualmente presente en Ecuador y Venezuela, desplazando a la Sigatoka amarilla en zonas de altura superior a los 1000 metros, donde el cultivo de plátano es muy importante.

Según Jones (1990), la Sigatoka negra es uno de los factores que más ha incidido en el decaimiento de la industria bananera para exportación.

### 2.2.1. Biología del hongo causante de la Sigatoka negra.

*Mycosphaerella fijiensis* Morelet pertenece a la clase *Ascomycete*, orden *Dothiales*, familia *Dothiaceas*. El género *Mycosphaerella* agrupa aproximadamente 1000 especies, la mayoría saprófitos, otros son parásitos de plantas de importancia económica (Alexopoulos 1962).

Leach (1964), describió la morfología del patógeno y propuso la denominación de *Mycosphaerella fijiensis*.

En 1976 Mulder y Stover, reportaron una nueva variedad de *M. fijiensis* llamada por ellos "*difformis*" por encontrar esporodoquios y conidióforos simples en los estomas, sin embargo estudios realizados en estas estructuras con aislamientos procedentes de varias localidades, permitieron declarar inconsistente esta clasificación, en la actualidad se denomina *Mycosphaerella fijiensis* al estado sexual y *Paracercospora fijiensis* al estado asexual (Pons, 1987) (Fig.1).

La fase asexual se presenta en el desarrollo de las primeras lesiones de la enfermedad (pizca, estrías), observándose la presencia de conidióforos con conidios, que salen mayormente de los estomas de la superficie inferior de las hojas. Según Meredith y Lawrence (1969), los primeros conidióforos en dejar de producir conidios son los que se ubican al centro del primer estado de estrías, mientras que los últimos, los más cercanos a la periferia.

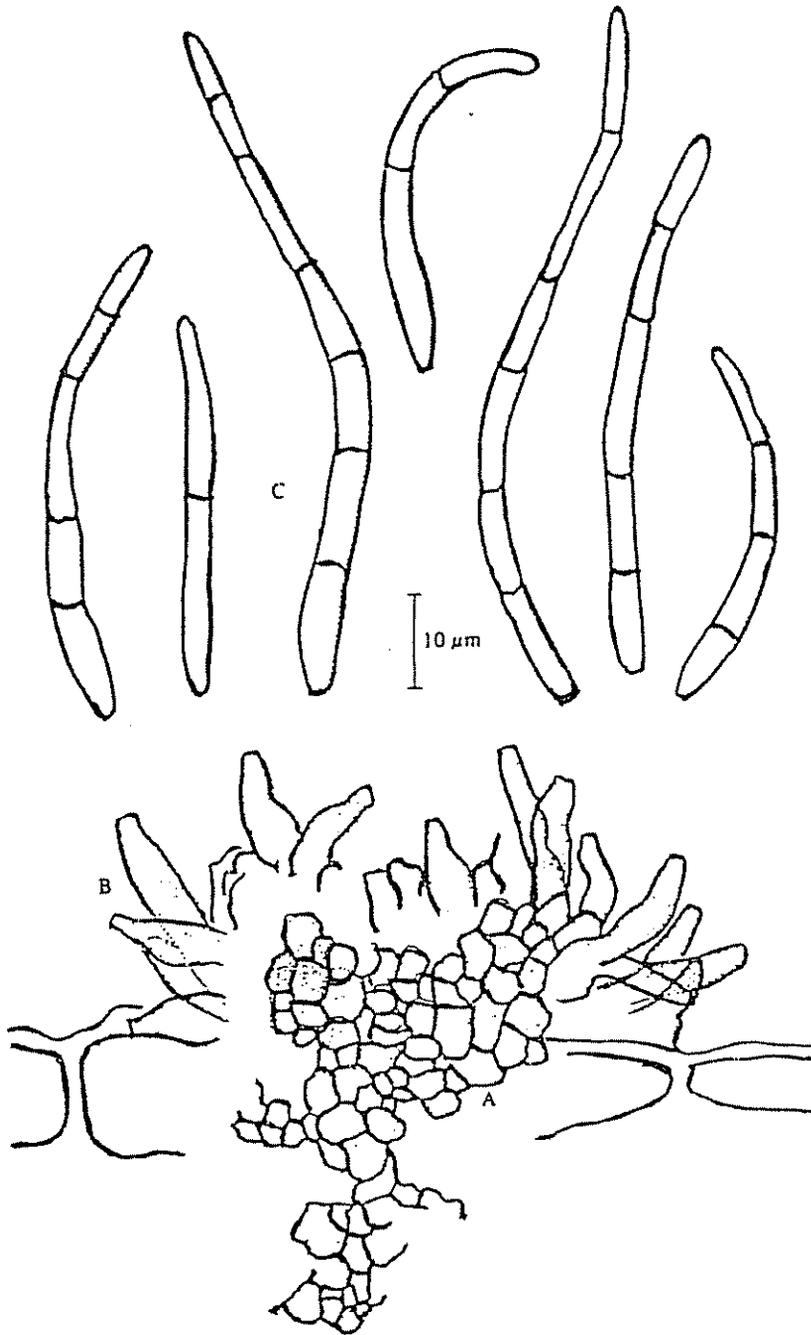


Figura 1. Morfología de la estructura reproductiva asexual de *Mycosphaerella fijiensis* (*Cercospora fijiensis*). A. estroma, B. conidióforo, C. conidios.

Posteriormente cesa la producción de conidióforos, en el desarrollo de la lesión, iniciándose la fase sexual (sobre el 1° estado de manchas), que se caracteriza por la producción de gran cantidad de ascosporas en estructuras llamadas peritecios, formados sobre los estomas de la parte superior e inferior de la mancha foliar (Pons 1987; Marín y Romero 1992).

Según Meredith *et al* (1973), la fuente más importante de inóculo son las ascosporas. Leach (1964), anota que *M. fijiensis* libera muchísimo más ascosporas (7000/pulgada<sup>2</sup>), que *M. musicola* (1500/pulgada<sup>2</sup>). Después de una lluvia mínima de 0.25mm con las hojas bien mojadas empieza a liberar el 85% de las ascosporas en las dos horas siguientes (Stover, 1972).

Stover (1983), reporta que bajo condiciones óptimas de temperatura y precipitación las ascosporas maduras pueden estar presentes tres a cuatro semanas después de la aparición de las primeras manchas.

También los conidios son fuentes importante de inóculo; según Quiñon (1972), una estría de Sigatoka negra puede producir 134 conidióforos cada uno con seis conidios, lo que implica que cada estría es capaz de producir más de 800 conidios.

#### 2.4. Susceptibilidad de cultivares de *Musa sp.*

las relaciones (hospedero-patógeno) en el caso del género *Musa* y *M. fijiensis* puede estar gobernada, según Laville (1983), por un gran número de genes que confirien un gradiente de reacciones que van desde la extrema sensibilidad a la resistencia.

Según Meredith y Lawrence (1969), los materiales susceptibles presentan la siguiente secuencia de síntomas.

- Estado 1: Pequeñas pizcas color pardo rojizo de aproximadamente 0.25mm, sobre la cara inferior de la hoja.
- Estado 2: Primer estado de estria; las pizcas iniciales se alargan y se unen formando estrias paralelas a las venas secundarias de color pardo rojizo.
- Estado 3: Segundo estado de estrias; estas se alargan y ensanchan cambiando de pardo rojizo a pardo oscuro o casi negro.
- Estado 4: Primer estado de manchas; las estrias se ensanchan tomando forma elíptica, son de color pardo oscuro y están rodeadas por un halo claro, pardo y acuoso.
- Estado 5: Segundo estado de mancha; con el centro de la lesión ligeramente hundido, de color oscuro. A veces con halo clorótico.
- Estado 6: Centro de la lesión necrosado y hundido, la mancha es rodeada por un halo angosto de color pardo oscuro o negro y forma bien definida. Halo clorótico rodeando la lesión.

González (1987), anota que todas las variedades comerciales de banano (AAA) y plátano (AAB) son susceptibles a la enfermedad. Los plátanos con dominancia *balbisiana* han demostrado mayor tolerancia a la Sigatoka negra; como los clones Pelipita (ABB) y Saba (ABB); sin embargo, la presencia de un solo genoma B no confiere o raramente confiere a las variedades mayor resistencia a *M. fijiensis* (Laville, 1983).

Fouré (1985), estudió la sensibilidad varietal a *M. fijiensis* de los plátanos y bananos de los genomas AAB y AAA., encontrando diferentes grados de resistencia entre algunos cultivares de ambos grupos.

El mismo autor, encontró que los clones Fougamou ABB y Saba ABB presentaron menos sensibilidad, mientras que Maduranga y Benedetta ambas con genoma AAB presentaron mayor sensibilidad al hongo, aunque menor a los clones del grupo "Cavendish".

En el caso del grupo con genoma A: el diploide AA "Figue Sucrée" presentó muy baja sensibilidad. El cultivar Yangambi (AAA), resultó altamente resistente con bloqueo de la enfermedad en los primeros estadios. al Contrario los triploides : "Poyo", "Gran Enano" y "Gros Michel", todos también con genoma AAA, fueron extremadamente susceptibles. (Fouré et al. 1990; Fouré, 1985).

La progenie de *Musa acuminata ssp. burmannica*, tiene alta resistencia a la Sigatoka negra (Soto, 1985).

Argent (1976), reporta como resistente a la mayoría de las especies silvestres de *Musa* de Papúa Nueva Guinea. Estas son *M. balbisiana*, *M. boman*, *M. ingens*, *M. maclayl* y *M. schizocarpa*.

## 2.5. Programas de Mejoramiento genético.

La selección y mejoramiento de los bananos comerciales, se inició en Jamaica con la fundación del Imperial College of Tropical Agriculture en el año 1922. Su objetivo principal fue producir un banano con las características del "Gros Michel" pero resistente a la "Marchitez por Fusarium" causada por el hongo *Fusarium oxysporum f.s. cubenses* (Shepherd, 1986).

La llegada a América de la Sigatoka negra, determinó la necesidad imperiosa de orientar el mejoramiento genético hacia la producción de plantas resistentes a dicha enfermedad; con características de productividad y de mercadeo de los clones del subgrupo "Cavendish" (Soto 1982).

El trabajo de mejoramiento genético convencional que inició la United Fruit Company con introducciones de clones de Filipinas, Java, Malasia, Bali, Papúa Nueva Guinea e Islas Salomón, va dirigido a encontrar diploides resistentes a la Sigatoka, especialmente a la Sigatoka negra, al nemátodo barrenador *Radopholus similis* y a la "marchitez por Fusarium" *Fusarium oxysporum* (raza 4). Tales diploides serían usados como progenitores masculinos para ser cruzados con el triploide Highgate. La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), recuperó el programa de la United Fruit Company en 1984; y en la actualidad ha desarrollado diploides híbridos y tetraploides con resistencia a la Sigatoka negra; como el SH-3481 (FHIA-01), híbrido derivado del cruce del diploide SH-3142 con el triploide "Prata Enano" (AAB). Este tetraploide está en proceso de liberación (Rowe, 1993; Rowe, 1976).

Shepherd, en la conducción del programa de mejoramiento genético de Jamaica, ha logrado la producción de tetraploides que presentan resistencia a la Sigatoka negra, así como a las razas 1 y 2 del "Marchitez por Fusarium" (*F. oxysporum*) y tolerancia al ataque del nemátodo *Radopholus similis*, con rendimientos similares a los del banano Cavendish (Soto, 1985).

El programa de mejoramiento genéticos del INIVIT (Instituto de Investigación de Viandas Tropicales) en Cuba, trabaja en la obtención de clones superiores de bananos y búsqueda de plátanos similares en sabor y calidad a los platains, con resistencia a Sigatoka negra, Sigatoka amarilla, Marchitez por *Fusarium* y nemátodos, mediante introducción de mutaciones, introducción de clones foráneos, la hibridación y también mediante la explotación somaclonal (Infomusa 1992).

Los programas de mejoramientos de Brasil y Honduras, en la actualidad, utilizan la fertilidad residual femenina de algunos triploides que hibridizan con diploides sintéticos mejorados, para la creación de tetraploides. En Francia se utilizan diploides mejorados cuyo genoma doblan con colchicina para crear individuos tetraploides. En ambos casos los tetraploides se cruzan con diploides mejorados para la obtención de triploides.

Según Bakry *et al* (1990), el programa de mejoramiento del banano desarrollado por el IRFA/CIRAD, considera dos estrategias:

- 1) Selección y mejoramiento del banano por métodos convencionales (hibridación), a corto y mediano plazo. A corto plazo se plantea la producción de nuevos tetraploides y el utilizar un pariente macho diploide resistente. A largo plazo, se espera a través del mejoramiento de poblaciones diploides de *Musa acuminata*, obtener diploides mejorados aptos para la creación de híbridos triploides sintéticos.

- 2) La utilización del cultivo *in vitro* y de la biotecnología para aumentar la variabilidad genética, utilizando agentes de presión de selección en callos y

suspensiones celulares o por transformación genética y obtención de plantas transgénicas.

Según Escalant (1989), el uso de técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* podría ofrecer un valioso medio de generación y selección de plantas variantes de plátano y banano resistentes a la Sigatoka negra. El método ha sido usado en caña de azúcar (Heinz et al. 1977), maíz (Gengenbach et al. 1977; Brettell et al. 1979), papa (Shephard et al. 1980) y nabo (Sacristan, 1982), como fuente de nuevos clones resistentes a enfermedades fungosas, bacterianas o virales.

La selección precoz *in vitro* de nuevos clones puede hacerse exponiendo callos, embriones, suspensiones celulares, brotes apicales, a toxinas del patógeno en el medio de cultivo, colocando también, conidios directamente sobre la superficie de los callos o inoculando la toxina sobre hojas de vitroplantas jóvenes (Mourichon et al. (1987).

Los métodos de inoculación *in vitro* ofrecen muchas ventajas que incluyen; control del nivel de inóculo, control del ambiente y acceso a plantas libres de la enfermedad (Escalant 1989).

Mourichon et al.(1987), realizaron inoculaciones utilizando conidios en hojas de vitroplantas de los clones "Gran Enano", "Fougamou" y "Yangambí" los cuales poseen diferente sensibilidad al hongo. Encontraron las mismas reacciones diferenciales. En "Gran Enano" el estado seis se alcanzó a los 38 días, en "Fougamou" el desarrollo de la enfermedad fue más lenta, puesto que a los 38 días solo había alcanzado el estado 3. En "Yangambí" a partir del estado 2 se produjo un bloqueo completo del patógeno. resultados similares obtuvo Beveraggi (1988).

## 2.6. Interacción hospedante-patógeno.

La interacción inicial del patógeno con el hospedero ocasiona una alteración fundamental del metabolismo del hospedero y hasta cierto grado del patógeno. Estos cambios iniciales se amplían de manera que el desarrollo siguiente de la enfermedad representa una acción recíproca continua de la actividad metabólica alterada (Young *et al.* 1978).

Según Hiort (1985), los mecanismos responsables de la interacción se encuentran bajo control metabólico, tanto del hospedero como del patógeno, y están determinados por su constitución genética y el medio ambiente.

### 2.6.1 Resistencia de las plantas al ataque de patógenos.

La resistencia a las enfermedades es la capacidad inherente de un hospedante para impedir o reducir la entrada y las actividades subsiguientes de un agente patógeno cuando la planta está expuesta, en condiciones ambientales adecuadas, a una cantidad de inóculo suficiente para provocar la enfermedad (Young *et al.* 1978).

Según Hiort (1985), existen tres tipos de resistencia genéticas: inmunidad, resistencia específica y resistencia general.

El concepto "planta inmune" según Müller (1950), se aplica cuando determinados genotipos de una especie de planta no son invadidos por ninguna raza de una especie de patógeno (mientras otros lo son), o cuando el rechazo del patógeno no origina ningún síntoma visible, como manchas necróticas.

Según Agrios (1986), la resistencia específica o vertical de una planta a un patógeno es resultado de uno o varios mecanismos de defensa controlados por uno o varios genes, puede ser monogénica u oligogénica y los genes que la codifican se conocen como genes mayores.

Caldwell (1968), anota que la resistencia específica casi siempre se caracteriza por una reacción de incompatibilidad (hipersensibilidad), en el encuentro de determinados genotipos de una especie de hospedero y del patógeno, mientras otros son compatibles.

Según Cornide *et al.* (1980), el mecanismo de hipersensibilidad es muy frecuente en caso de resistencia vertical o específica y en el están involucrados no sólo los procesos que conducen a la inactivación del patógeno, sino además, aquellos que reparan el tejido adyacente al punto inicial de penetración. Király, Barna y Ersek (1972), anotan que este tipo de resistencia se caracteriza por la desorganización, necrosis y muerte de las células en el sitio de infección, en las células en vías de morir y sus vecinas, a menudo se originan altas concentraciones de determinadas sustancias tóxicas, llamadas fitoalexinas (Hiort, 1985). Se ha discutido si el fenómeno de hipersensibilidad es la causa o el efecto de la resistencia de la planta. Király (1980), concluye que dicho fenómeno debe considerarse como una manifestación visual de la resistencia de las plantas a agentes o a razas de patógenos.

Para Agrios (1986), la resistencia horizontal o general se debe a una combinación de mecanismos de defensa menos eficientes, cada uno de los cuales es individualmente ineficaz contra el patógeno y son controlados por un grupo o grupos de genes complementarios. Este tipo de resistencia es

casi siempre poligénica y está controlada por genes menores. Según Hiort (1985), la resistencia general se dirige en intensidad similar contra todas las razas del patógeno, no produciéndose interacciones específicas entre determinados genotipos de los antagonistas.

Las variedades con resistencia específica (monogénica u oligogénica), por lo general muestran resistencia completa a un patógeno específico en la mayoría de las condiciones ambientales. A nivel de planta se impide el establecimiento y multiplicación del patógeno en el hospedante, mientras que a nivel de campo retarda la aparición de la enfermedad y disminuye la producción de inóculo. En cambio, las variedades que presentan resistencia horizontal (poligénica), son menos estables y pueden variar en su reacción al patógeno en diferentes condiciones ambientales. Sin embargo retrasa el desarrollo de una epidemia al reducir la intensidad de la infección, además un patógeno tendrá que experimentar muchas mutaciones para abatir por completo la resistencia del hospedero.

Aunque la resistencia horizontal resulte más deseable es mucho más difícil su manipulación en programas de mejoramiento genético lo que limita su uso. (Cornide et al. 1985; Agrios 1986; Bauer 1984).

#### 2.6.2. Mecanismos de defensas de las plantas al ataque de patógenos.

Las plantas están sujetas al ataque de los diferentes tipos de hongos, bacterias, micoplasmas, virus, nemátodos etc. en cualquier estado de su desarrollo ontogénico. Sin embargo ellas contrarrestan el ataque ya sea mediante características estructurales que actúan como barreras físicas e impiden que el patógeno penetre y propague en ellas

o por medio de sustancias bioquímicas. Ambos mecanismos de defensa pueden estar presentes antes del ataque del patógeno o pueden ser activados como repuestas a la infección causada por el patógeno (Agrios 1986).

Los mecanismos estructurales preexistente tales como: cutícula gruesa, cantidad y calidad de la cera, tamaño, localización y forma de los estomas y lenticelas, presencia de pelos glandulares, estructura de las paredes de las células epidérmicas; así como los inducidos (defensas histológicas) que comprenden: formación de cubiertas de corcho, tejidos de abscisión, formación de tálides, secreción de gomas, son importantes en el rechazo y limitación de muchos agentes patógenos en el hospedante y pueden estar también implicados en la expresión del grado de resistencia de una especie de planta (Melander y Cragie 1927; Knight 1952; Edney 1958; Roberts y Martín 1963; Beveraggi 1993).

El potencial bioquímico de una especie de hospedero constituido por compuestos antibióticos preexistentes e inducidos, son el factor de mayor interés de estudio, dada la naturaleza bioquímica del ataque de un patógeno (Agrios 1986; Young *et al.* 1978; Hiorth 1985; Manners 1986). Según Manners (1986), algunos tipos de resistencia bioquímica se deben a compuestos antibióticos ya existentes en plantas intactas y a otros formados en respuesta a la presencia del patógeno. Según Young *et al.* (1978), el potencial bioquímico se evidencia mediante la inhibición del crecimiento y del desarrollo del patógeno, por causa de la restricción impuesta por el hospedero, para la producción o distribución interna de los productos del patógeno que inducen el mal o por la falta de reacción de tales productos. Schlosser (1980), define las sustancias antibióticas constitutivas como aquellas que están presentes en cantidades suficientes,

dentro de todas las partes invadidas por el patógeno y bajo una forma capaz de actuar sobre este último.

Ingham (1973), cita un ejemplo clásico de sustancias constitutivas en cebolla con pigmento rojo en sus cáscaras exteriores muertas, las cuales son resistentes a *Colletotrichum circinans*, por contener grandes cantidades de catecol y ácido protocatequico (Walker y Stahmann 1955), dos sustancias venenosa, tanto para las estructuras reproductivas como al micelio de este hongo.

Manners (1986), sugiere que los factores de resistencia bioquímicos preformados (constitutivos), deben ser mas tóxicos para el patógeno que para el hospedero, o deben estar limitados físicamente o ligados químicamente de modo tal que la toxina no dañe indebidamente a los tejidos del hospedero.

Según Ingham (1973), la infección puede aumentar la concentración de sustancias constitutivas mediante una síntesis intensificada, llegando a tener efectos marcadamente tóxicos; o también pueden ser liberadas sustancias represivas las que incluyen a la mayoría de los compuestas fenólicos, (que pueden ser abundante tanto en tejido sano como enfermo), a los productos de su oxidación y a las fitoalexinas que en su mayoría también son compuestos fenólicos (Agris 1986). La acumulación en plantas de compuestos fenólicos y sus productos de oxidación en respuestas a la infección y el daño de diversos patógenos ha sido descrito por diversos autores, (Farkas and Király, 1962; Mace, 1964; Cruickshank y Perrin, 1964; Kuc, 1964; Rubin and Artsikhovakaya, 1964; Patil and Dimond, 1967; Rohringer and Samborski, 1967; Metlitskii and Ozeretskoykaya, 1968; Jayapal and Mahadevan, 1968; Kosuge, 1969; Mueller and Beckman, 1973; Mueller and Beckman, 1976; Eric, 1976; Williams and Harborne, 1977; Goodman *et al.*,

1986; Mateille, 1992). Muchos de estos compuestos y sus derivados exhiben propiedades antibióticas y por lo tanto, se considera que juegan un papel importante en la resistencia a enfermedades.

Carrasco *et al.* (1978), manifiestan que el tratamiento de plantas susceptibles de tomate con ácido quinónico y fenil alanina, incrementa el contenido de fenoles en los tejidos así como la resistencia a *Fusarium oxysporum*. Según Leatham *et al.* (1980), los productos fenólicos oxidados, son más tóxicos a los microorganismos que en sus formas reducidas. Los quinones de radicales libres pueden inactivar, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos (Kosuge 1969); también pueden interferir en actividades enzimáticas por restricción de cofactores metálicos, o por competencia por sustrato (Webb 1966; Kosuge 1969).

Otros grupos de compuestos fenólicos son las fitoalexinas, término propuesto por Müller y Borger (1941), basados en los resultados de experimentos sobre la relaciones hospedero-patógeno entre el cultivo de la papa y razas de *Phytophthora infestans*. Las fitoalexinas según Paxton, (1981) son antibióticos producidos por la interacción del hospedero y el patógeno. Se consideran como compuestos antimicrobianos de peso molecular bajo, que son sintetizados y acumulados por las plantas después de iniciado el proceso de infección por el patógeno. Las fitoalexinas son inducidas por la presencia del patógeno; no son específicas en su toxicidad hacia los hongos pero son más activas contra ciertos grupos fungosos. Son producidas en las células vivas de algunas plantas y su síntesis es favorecida por elicitores que son carbohidratos de origen microbiano que estimulan la producción de fitoalexinas. (Levin, 1976),

Según Keen (1975), las fitoalexinas se han encontrado en 75 especies representadas en 20 familias y son catalogadas como metabolitos secundarios o metabolitos de estrés. Dentro de los núcleos básicos de metabolitos secundarios se han encontrado fitoalexinas con núcleos de: flavonoides e isoflavonoides en leguminosas (Moesta y Crisebach 1980), diterpenos en euphorbiáceas y gramíneas (Bioley *et al.* 1987), alcaloides en rutáceas y solanáceas (Barley and Mansfield, 1982), coumarina en umbelíferas y leguminosas.

UPEB (1992), informa sobre el aislamiento de fitoalexinas en banano atacado por Sigatoka negra. Los resultados indican que de las hojas atacadas por el hongo (*M. fijiensis*), se aisló una sustancia de color café oscuro, que se sitúa en el grupo de metabolitos secundarios denominados flavonoides. Estas sustancias aisladas actuarían como un protector natural de la planta, deteniendo el crecimiento del hongo.

La producción de fitoalexinas puede ser inducida por factores bióticos como algunas especies de hongos, bacterias, virus o nemátodos; por factores abióticos químicos como algunos fungicidas y sales metálicas; o factores abióticos físicos como luz ultravioleta, daño mecánico o congelación (Paxton 1981).

### **2.6.3. Selección de materiales sometidos a toxinas del patógeno (Patotoxinas).**

Wheeler y Luke (1963), introducen el término patotoxina para aquellos productos elaborados por el patógeno. De acuerdo con los mismos autores, las patotoxinas son capaces de provocar en las plantas susceptibles todos o casi todos los síntomas característicos de las plantas infectadas y

exhiben la misma especificidad con respecto al hospedante que el organismo causal produce. La capacidad del patógeno para producir toxina es proporcional a su habilidad para causar la enfermedad y solamente una toxina está involucrada en el síndrome de la enfermedad.

Según Scheffer y Pingle (1963), las cepas patógenas de *Helminthosporium victoriae* produce la toxina llamada victorina, es tóxica a concentraciones de aproximadamente 0.0002 µg/ml en cultivares de avena susceptibles, sin embargo concentraciones aún mayores no producen efecto alguno en los cultivares resistentes.

Muchas especies del género *Cercospora* producen metabólitos fitotóxicos, (Balis y Payne, 1971; Fajola, 1973; Mumma *et al.* 1973; Assante *et al.* 1977; Camarda *et al.* 1979; Sasaki *et al.* 1981; Daub, 1982; Viseur, 1984).

Molina y Krausz (1989), evaluaron la actividad fitotóxica de extractos de cultivos de *M. fijiensis* var. *difformis* y su uso para evaluar patrones de resistencia a Sigatoka negra. De las pruebas se obtuvieron resultados positivos para siete cultivares en correlación con sensibilidades ya observadas en el campo.

Stierle *et al.* (1991), describieron el aislamiento de varios compuestos aromáticos de cultivos líquidos de *M. fijiensis*. El más abundante y fitotóxico de todos los compuestos fue el 2,4,8-trihidroxitetralona, el cual indujo lesiones necróticas a una dosis de 5µl en menos de 12 horas en cultivares sensibles de *Musa*. Este compuesto mostró una selectividad hacia el hospedero que imita al patógeno.

Upadhyay, Strobel y Coval (1990), encontraron cinco fracciones tóxicas en el extracto crudo de *M. fijiensis*, reveladas por la actividad biológica diferencial, observadas en pruebas de hojas de cultivares de *Musa* sp. y en las cromatografías realizadas.

Según Young *et al.* (1978), cuando existe especificidad biológica entre la patotoxina y la planta, es posible idear procedimientos rápidos y baratos para seleccionar individuos resistentes a la enfermedad dentro de numerosas poblaciones de plantas.

Daub (1986), refiere que células y protoplastos pueden ser seleccionados por su resistencia a metabolitos fitotóxicos producidos por un agente patógeno, y plantas con una respuesta alterada por la infección del patógeno, pueden regenerarse de estos cultivos de células.

Chawla y Wenzel (1987), evaluaron la producción de callos derivados de embriones inmaduros de genotipos de cebada y trigo bajo el efecto de un filtrado del hongo *Helminthosporium sativum*, obteniendo de un 6 a 17% de callos sobrevivientes. Encontraron diferencias entre los callos sin presión del filtrado y los callos sobrevivientes al tratamiento con la toxina ya que éstos últimos resultaron menos susceptibles al hongo.

Carlson (1973), obtuvo plantas de tabaco resistentes a la infección por *Pseudomonas tabaci* mediante la selección de líneas resistentes a la metionina sulfoxina, que transmiten esta propiedad como un carácter sencillo semidominante.

Pacheco y Buitrago (1991), evaluaron el efecto del filtrado de *Colletotrichum* sp. en la expresión de síntomas de mancha mantecosa en cafetos cultivados *in vitro*, y encontraron que algunas plantas regeneradas del material susceptible sometido al filtrado del patógeno en dilución 1:3, no desarrollaron síntomas de la enfermedad.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Localización del área experimental

La investigación sobre la obtención y actividad tóxica del extracto crudo del hongo *M. fijiensis* se llevó a cabo en los laboratorios de Ganadería Tropical y de Fitopatología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, desde Diciembre de 1993 hasta Diciembre de 1994.

La investigación sobre la identificación *in vitro* de clones de *Musa sp.* a diferentes concentraciones del extracto crudo del hongo se realizó en la Unidad de Biotecnología del CATIE.

#### 3.2. Material experimental.

##### 3.2.1. Material vegetal.

El material vegetal que se evaluó (Cuadro 1.) fue reproducido con la técnica de cultivo *in vitro* de ápices en la Unidad de Biotecnología del CATIE.

Para la evaluación en invernadero utilizando conidios de *M. fijiensis* se utilizaron hojas del diploide *Musa acuminata ssp. burmannicoides* ("Calcuta 4") (AA) y del cultivar triploide "Gran Enano" (AAA); se eligieron estos materiales por presentar diferente sensibilidad a *M. fijiensis*. Para la evaluación del efecto del extracto crudo sobre hojas se usaron todos los materiales del Cuadro 1. Para la evaluación *in vitro* se utilizaron, callos provenientes del cultivo de embriones cigóticos inmaduros de 45 a 60 días, de "Calcuta 4", los cuales según Marroquin (1992), muestran mayor

capacidad para la formación de callo. En el caso de "Gran Enano", se escogieron las flores masculinas de los rangos 6 a 14 del meristemo floral, para la producción de callos (Escalant *et al.* 1994).

CUADRO 1. Materiales de *Musa sp.* utilizados en las diferentes investigaciones.

CLON	GENOMA	GRADO DE RESISTENCIA A <i>M. fijiensis</i> .*
<i>Musa acuminata</i> ssp <i>burmannicoides</i> (Calcuta 4)	AA	Hipersensible
Yangambi	AAA	Hipersensible
Gran Enano	AAA	Susceptible
Curraré	AAB	Susceptible
Saba	ABB	Resistente
Embrapa 403 (Bras-403)	AAAB	Resistente

\*Según (Rosales, 1993; Marín, 1993; Fouré, 1993; Pasberg, 1993; Mourichon, *et al.* 1987; Beveraggi, 1988).

### 3.2.2. Aislamientos del hongo.

Se utilizaron cepas del hongo *M. fijiensis* aisladas de tejido foliar de banano ("Gran Enano"), proveniente de la zona de Matina, provincia Limón, Costa Rica.

### 3.3. Inoculación de vitroplantas utilizando conidios.

Esta prueba se realizó con la finalidad de evaluar el grado de resistencia de los materiales "Gran Enano" y "Calcuta 4" y comprobar la virulencia de los aislamientos a ser utilizados en la obtención del extracto crudo. Para ello se siguió la metodología descrita por Mourichon (1987). Se licuaron en 15 ml de agua destilada estéril, 3g de micelio de

14 días de crecimiento sobre el medio V8. La suspensión de conidios obtenidos que fué filtrada, usando una maya de tela fina. De esta suspensión se tomó una alícuota que fue colocada en un hematocimetro con el fin de calcular su concentración. Una vez determinada la concentración de la suspensión conidial y miceliar ( $9.4 \times 10^4$  conidios) y su volumen (30 cc), se le añadió gelatina al 1% para aumentar la adherencia del inóculo sobre el limbo foliar.

Las inoculaciones se realizaron por aspersion de  $9.4 \times 10^4$  conidios/cc de suspensión sobre la cara inferior de la segunda hoja completamente desarrollada en vitroplantas de 12 a 14 semanas de edad de los materiales "Calcuta 4" y "Gran Enano".

A fin de favorecer el desarrollo de la enfermedad, las plantas se colocaron en una cámara de incubación instalada en el invernadero. En los primeros siete días las plantas fueron sometidas a una humedad saturada de 100%. Durante el resto del ensayo, las plantas fueron sometidas a un regimen de humedad relativa que varió de 50 a 70% de día y 100% de noche.

### 3.3.1. Evaluación de los síntomas.

La evolución de la enfermedad se siguió mediante la escala de síntomas descripta por Fouré (1982).

- Estado 1: Puntuaciones pequeñas pardo rojizo menores de 0.5mm de longitud.
- Estado 2: Raya parda herrumbrosa inferior a 4mm.
- Estado 3: Raya alargada y ensanchada.
- Estado 4: Mancha parda elíptica.
- Estado 5: Mancha parda negra rodeada de una zona clorótica amarilla.
- Estado 6: Centro de la mancha seco, la lesión está rodeada por un margen negro.

En la evolución de los síntomas se evaluaron las siguientes variables epidemiológicas por medio de observaciones diarias:

**Período de incubación ( $P_i$ );** tiempo transcurrido entre el día de la inoculación y la observación del primer síntoma (estado 1).

**Período de evolución ( $P_e$ );** el tiempo transcurrido desde la aparición del primer síntoma y el estado de mancha (estado 6).

**Período de desarrollo ( $P_d$ );** corresponde a la adición en días del  $P_i$  y  $P_e$ .

La evaluación de los síntomas se realizó sobre la segunda y tercera hoja desplegada de los materiales "Gran Enano" y "Calcuta 4". Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones.

Se realizó por un análisis de varianza hecho del promedio de las observaciones de ambas hojas para cada variable epidemiológica. Para la separación de medias se utilizó la prueba de DMS.

### 3.4. Evaluación de la actividad biológica o tóxica del extracto crudo de *M. fijiensis*.

#### 3.4.1. Obtención del inóculo del hongo.

Se utilizaron cultivos monospóricos los cuales se pusieron a crecer en tubos inclinados con Mycophyl-agua por 10 días. Una vez crecida la cepa, se colocó en platos petri sobre un medio V-8 modificado (100 ml de V8, 0,2 g de CaCO<sub>3</sub> y 20 g de agar diluidos en 900 ml de agua), apto para la producción de conidios. Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 25 °C y luz continua (Mourichon 1987), por espacio de 14 días para ser transferidos al medio líquido M-1-D modificado por Strobel (1989), donde continuó creciendo, para la producción de toxina (anexo 1A). Para esto se colocó 250 ml del medio M-1-D en erlenmeyers de 500 ml, autoclavándolo por 15 minutos a dos atmósferas y 121.6 °C (French y Hebert 1982); después de alcanzar la temperatura ambiente, se inoculó con cuatro discos de 1 cm<sup>2</sup> de cepa del hongo *M. fijiensis*, con micelio y conidios. Estos erlenmeyers se mantuvieron en incubadora en oscuridad total (envolviendolos en papel de aluminio), a una temperatura de 28 °C durante cuatro semanas, hasta que se observó un crecimiento abundante del hongo.

#### 3.4.2. Obtención del extracto crudo del hongo.

Después de cuatro semanas, y con el fin de eliminar el micelio, se filtró el medio líquido utilizando un kitazato, un embudo de porcelana, papel filtro de 11 cm de diámetro y 0.5 mm de retención y una bomba de succión.

El filtrado se concentró hasta un tercio del volumen con la ayuda de un rotaevaporador a 40 °C, en una hora y 30 minutos. Problemas en el equipo de rotaevaporación, obligaron, en principio a efectuar las concentraciones a 70 u 80 °C. La fracción resultante (300 ml) se acidificó con HCL 0.1 N y se añadió acetato de etilo (vol 1/1), luego se agitó a 140 rpm en oscuridad por 48 horas (Molina y Krausz, 1989). Posteriormente, con un embudo separador, se procedió a decantar el acetato de etilo el cual se recogió en un balón; a la fracción acuosa, (medio M-1-D) de la misma muestra se le realizaron tres extracciones usando acetato de etilo (vol 1/1) agitando la mezcla vigorosamente en cada ocasión. Las cuatro extracciones fueron combinadas y rotaevaporadas a 30 °C hasta lograr un concentrado de acetato de etilo de color amarillento, que se colocó en un tubo de 5 ml previamente pesado y puesto a secar en baño de María a 40 °C bajo una fuerte corriente de aire. El peso de los residuos secos se obtuvo por diferencia, pesando nuevamente los tubos.

### 3.4.3. Pruebas biológicas preliminares usando el extracto crudo de *M. fijiensis* sobre hojas de vitroplantas.

Estas pruebas se realizaron con la finalidad de: 1) comprobar desde el inicio la fitotoxicidad del extracto y observar si ésta se mantenía hasta el final del proceso. 2) observar la actividad biológica del extracto inoculado en el haz de las hojas en plantas colocadas en invernadero. Asimismo se inoculó por el envés hojas previamente separadas de la plantas, y colocadas en incubadora. 3) observar en incubadora si la actividad biológica era mayor en condiciones de oscuridad total o en oscuridad parcial (8 horas y 16 de luz), sugerida esta condición por Mourichon (1994), (comunicación personal).

Para la realización de estas pruebas preliminares se utilizó hojas de los clones *Musa acuminata ssp. burmannicoides* ("Calcuta 4") y "Gran Enano". Se realizó 10 incisiones por hoja por cada tratamiento. A fin de comprobar la fitotoxicidad del extracto en cada paso de la metodología se realizaron diferentes inoculación:

- a) Colocación de 20  $\mu$ l del filtrado del medio M-1-D inoculado.
- b) Colocación de 20  $\mu$ l del filtrado concentrado rotaevaporado del medio M-1-D inoculado.
- c) Colocación de 20  $\mu$ l del rotaevaporado concentrado del medio M-1-D inoculado y conteniendo acetato de etilo. En esta prueba también se usó acetato de etilo como testigo.
- d) Colocación de 20  $\mu$ l (40  $\mu$ g) del extracto M-1-D inoculado. También se usó como testigo carbonato de sodio al 0.5% y fosfato monobásico 0.1 M.

En cada uno de estos tratamientos se incluyó un testigo correspondiente al medio sin inculo.

Las temperaturas usadas en las incubadoras fueron las mismas que se observaron en el invernadero del laboratorio de Fitopatología del CATIE; aproximadamente 21 °C a la oscuridad y 28 °C a la luz.

Debido a la escasez de material vegetal no se establecieron experimentos estadísticos formales.

### 3.4.5. Inoculación del extracto sobre hojas de vitroplantas de *Musa sp.* en incubadora con alternancia de luz.

Con la finalidad de verificar la virulencia de los extractos, se procedió a la inoculación en hojas separadas de plantas aclimatadas en invernadero, de 12 a 14 semanas de edad, de los clones del Cuadro 1. Los extractos fueron diluidos previamente utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\text{Extracto diluido} = \frac{X \text{ (mg de extracto)}}{2 \text{ ml de Na}_2\text{CO}_3 \text{ (al 0.5 \%)}}$$

Los mg de extracto seco fueron divididos entre 2, obteniéndose así la cantidad de ml de carbonato de sodio al 0,5% en que se diluyeron; esta dilución se colocó en un potenciómetro y se le agregó fosfato monobásico 0.1 M hasta que el pH fue 7, llegando al final a una solución de 40 µg de extracto/20 µl de medio líquido (Mourichon, 1993). Comunicación personal.

Se realizaron 30 incisiones (10 por cada tratamiento) por hoja sobre la cara abaxial con ayuda de una aguja de disección. Se emplearon dos hojas por cultivar, a las cuales se les aplicaron los siguientes tratamientos:

T0: 20 µl del testigo con agua destilada  
conteniendo carbonato de sodio al 0.5% y  
fosfato monobásico 0.1M.

TX: 20 µl del testigo con medio Strobel.

T1: 20 µl de la dilución del extracto.

Las inoculaciones se realizaron con una micropipeta calibrada al volumen requerido (20  $\mu$ l). Las hojas inoculadas se colocaron en cajas de plástico con suficiente humedad (fig.2), y posteriormente puestas en incubadora con un fotoperíodo de 15 horas de luz y 9 horas de oscuridad a una temperatura variable de 28 °C (luz) y 21 °C (oscuridad). Estas fueron aproximadamente las mismas temperaturas observadas en la prueba de invernadero utilizando conidios.

#### 3.4.6. Evaluación del efecto del extracto.

La evaluación del efecto del extracto se realizó midiendo las lesiones (largo y ancho) producida por los tratamientos a las 24, 48, 72, y 96, horas después de realizada la inoculación sobre las hojas.

Se usó un diseño completamente al azar con arreglo en parcelas divididas y cuatro repeticiones; las parcelas grandes correspondieron a los periodos de evaluación y las subparcelas a los diferentes tipos de inoculaciones. Para la separación de medias se utilizó la prueba de Duncan. Este ensayo se repitió dos veces para comprobar los resultados.

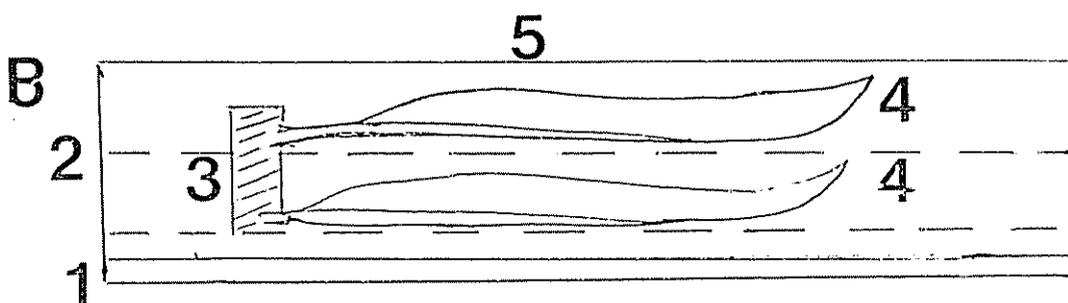
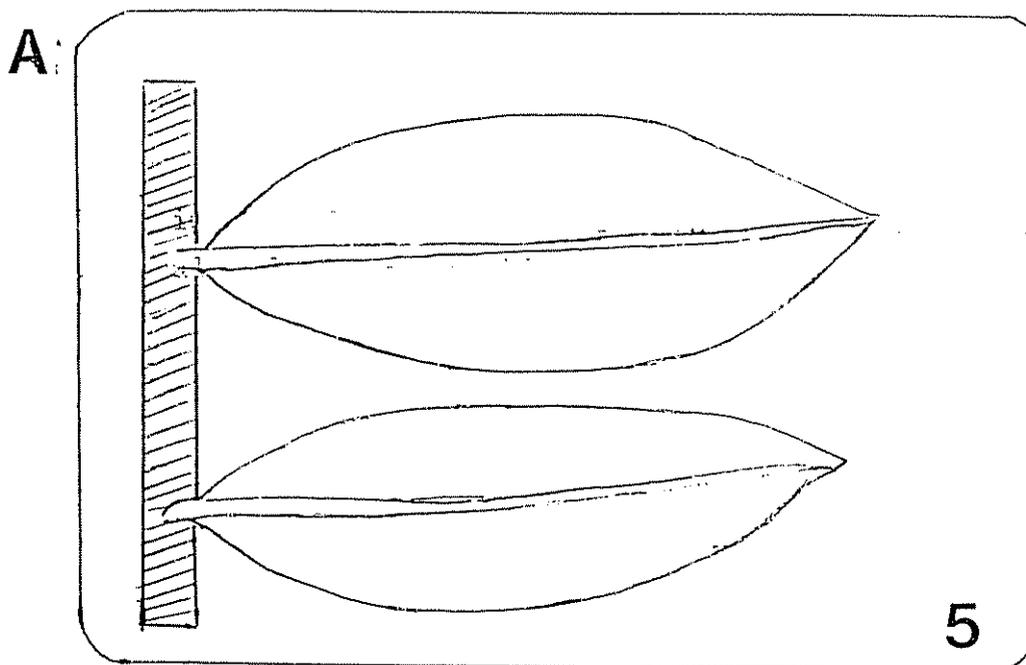


Figura 2. Cámara para la evaluación biológica del extracto crudo

A Vista desde arriba

B Vista lateral

- 1 Agua
- 2 Cedazo
- 3 Estereofón
- 4 hoja
- 5 Caja

Tomado de Acuña (1989).

### 3.5. Evaluación in vitro de clones de *Musa sp.* por su resistencia al extracto crudo de *M. fijiensis*.

#### 3.5.1. Preparación de los materiales de siembra *in vitro* y su cultivo.

Para el clon "Calcuta 4" se recolectaron frutos inmaduros de 45 a 60 días provenientes de la colección de Musaceas del CATIE. Estos fueron lavados en agua corriente y luego sumergidos en alcohol al 70% (v/v), durante tres minutos (Escalant y Teisson 1989).

Dentro de la cámara de flujo laminar el material se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Con la ayuda de una pinza y un bisturí se eliminó el pericarpio y se procedió al aislamiento de los embriones usando un estereoscopio; debido al tamaño muy pequeño de los embriones inmaduros fue necesario aislar el embrión con una porción de tegumento interno (anexo 2A).

Los embriones cigóticos se sembraron en medio de Murashige y Skoog (1962), con los macroelementos diluidos a la mitad, vitaminas de Morel (1950), sacarosa (60 g/l) gelrite (2 g/l), picloram (2 mg/l). El pH se ajustó a 5.8 previo a la esterilización en autoclave. El cultivo se colocó en la oscuridad a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

Una vez inducida la formación de callos, estos fueron transferidos a un medio MS (1962) completo; reduciéndose la concentración de picloram a 0.5 mg/l y la sacarosa a 30 g/l (MS pi0.5).

En el caso del triploide "Gran Enano" se recolectó la yema floral (chira) conteniendo las flores masculinas. Con ayuda de un cuchillo afilado se cortó ésta a 10 cm antes de la punta, se eliminó todas la brácteas hasta reducir la inflorescencia a 4 cm, esta fue lavada en agua corriente eliminándose un poco más de brácteas hasta llevarla a 3 cm de longitud aproximadamente. Luego se sumergió en alcohol al 70% por tres minutos. Dentro de la cámara de flujo laminar, tres lavados con agua estéril completaron la desinfección del material. Utilizando una pinza y un bisturí se procedió a eliminar un poco más de brácteas y sacar las manitas del rango de 6 a 14 correspondiendo el 6 al meristemo floral (Escalant *et al* 1994).

Las inflorescencias (manitas) se sembraron en un medio MS (1962), modificado por Shii *et al.* (1992); el MA<sub>1</sub> que consta de sales y vitaminas MS, biotina (1 mg/l), ácido 3-indol-acético (1 mg/l), ácido naftaleno-acético (1 mg/l), sacarosa (30 g/l), agarosa (6 g/l) y pH de 5.7 ajustado antes de la esterilización. Se mantuvieron durante 4 a 5 meses para la formación de callo, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a una temperatura de más o menos 27 °C (Escalant *et al.*, 1994).

### 3.5.2. Evaluación.

Esta prueba se realizó, con la finalidad de encontrar la dosis mínima efectiva del extracto crudo de *M. fijiensis*, que permita evaluar el grado de resistencia del material vegetal, en el tiempo mínimo de cultivo.

Se utilizaron los medios MS (P<sub>1</sub> 0.5) y (MA<sub>2</sub>), (Anexo 3A) para los callos de "Calcuta 4" y de "Gran Enano" respectivamente.

El extracto crudo fue esterilizado usando un filtro miliporo de 0.2  $\mu\text{m}$  y añadido al medio con la ayuda de una micropipeta calibrada al volumen deseado después de ser autoclavado. Para mantener el medio en estado líquido hasta su dispensación y con el fin de no desnaturalizar al extracto se usó un baño María calibrado a 40 °C.

Se trabajó en cajas de plástico de 24 pozos denominada 'nunc multidish' (anexo 4A), en cada pozo se añadió 2 ml de medio, más las diferentes concentraciones del extracto crudo.

Para ambos clones ("Gran Enano" y "Calcuta 4") se realizaron tres ensayos a través del tiempo usando diferentes niveles de extracto. en el primero se probó 20, 40 y 100  $\mu\text{g}$  que corresponde a 10, 20 y 50  $\mu\text{l}$  de extracto diluido. En la segunda prueba se usaron 200, 400 y 600  $\mu\text{g}$  de extracto (100, 200 y 300  $\mu\text{l}$  de la dilución), y en la tercera prueba se evaluaron concentraciones de 100, 120, 140, 160, 180, y 200  $\mu\text{g}$  del extracto, que corresponde a 50, 60, 70, 80, 90 y 100  $\mu\text{l}$  del extracto diluido. En el primer y segundo ensayo se usaron diferentes controles añadiendo 20  $\mu\text{l}$ : del extracto del medio Strobel (M-1-D) sin inóculo, de agua con carbonato de sodio al 0.5% y de fosfato monobásico 0.1 M. También se contempló los medios MS (Pi0.5) y (MA2) sin ningún tipo de inoculación.

En cada ensayos se evaluaron seis tratamientos, cada uno con un callo (anexo 4A). En ambos materiales los tratamientos fueron dispuesto en un diseño de bloques al azar con seis repeticiones. El ensayo se llevó a cabo en condiciones controladas, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y una temperatura de 27 °C  $\pm$  2. Se evaluó el evento necrosis, SI o NO. los resultados se analizaron por medio de la distribución binomial o de Bernoulli (Steel y Torrie 1988).

### 3.5.3. Evaluación histológica de las pruebas de evaluación.

Para la evaluación histológica, de la segunda prueba se hicieron tres muestreos (1 por semana), el primero a los siete días de cultivo, el segundo a los 14 días y el tercero a los 21 días. De la tercera prueba se hicieron dos muestreos, (también uno por semana), a los 14 y 21 días de cultivo. Los materiales muestreados fueron escogidos de los tratamientos con: 50, 60, 80, 90, 100 y 300  $\mu$ l de extracto crudo diluido, además de los diferentes testigos.

## 3.6. Estudio histológico.

### 3.6.1. Inclusión para corte en parafina.

Para observar el grado de respuesta del cultivo *in vitro* a la presencia del extracto se efectuaron cortes histológicos.

Para ello cada semana durante 35 días se tomaron muestras de los callos inoculados. Estas muestras fueron fijadas en F.A.A. (10 ml de formalina, 50 ml de alcohol de 95°, 35 ml de agua destilada, 5 ml de ácido acético) durante 48 horas, posteriormente fueron deshidratadas en una serie ascendente de etanol e infiltradas con parafina Paraplast Plus (anexo 5A). Seguidamente se hicieron bloques que fueron cortados a 8  $\mu$ m de grosor, los cortes se colocaron sobre portaobjetos cubiertos con adhesivo de Haupt y formalina; al día siguiente, fueron teñidos con la técnica de Safranina Fast-green y la técnica de cuadruple coloración (Safranina, Fast Green, Violeta Cristal, Orange G). Luego se le colocó dos gotas de Permunt y un cubreobjeto y se dejó secar. (anexo 5A) (CIRAD, 1989).

### 3.6.2. Procesamiento de muestra para observar fenoles.

De la inoculación con conidios se tomaron muestras de 1 cm<sup>2</sup> de tejido foliar enfermo a los 12, 20, 30, 40 y 50 días de inoculación. Estas fueron fijadas 48 horas en F.A.A., luego se colocaron en solución de hidróxido de sodio 2 N por 3 horas. Finalmente fueron puestas durante 20 minutos en el reactivo de Hoepfner modificado por Vorsatz (1942), colorante específico para fenoles, compuesto por: nitrito de sodio al 10%, urea al 20% y ácido acético glacial volumen 1:1:1 (Reeve, 1951).

Esta misma metodología fue empleada cuando se tomaron muestras de tejido foliar de los seis cultivares del cuadro 1, inoculados con el extracto crudo de *M. fijiensis*. Se tomaron muestras de 72 horas con tejido inoculado, testigo y tejido sano de los diferentes cultivos. El foliar fue fijado en F.A.A.. Luego fueron deshidratadas e infiltradas en Historesina-Jung, cortadas con un ultramicrotomo Sorvall MT1 a un grosor de 3.5 de micras en la unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad Costa Rica.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

##### 4.1. Inoculación de vitroplantas utilizando conidios.

Las inoculaciones realizadas sobre los materiales "Gran Enano" y "Calcuta 4", utilizando conidios permitieron, establecer diferencias entre ellos, las cuales se presentan en el Cuadro 2 y la Fig.3.

Los primeros síntomas de la enfermedad se observaron a los ocho días sobre el clon "Gran Enano", y se caracterizaron por pequeñas pizcas color pardo rojizo. El clon "Calcuta 4" presentó los primeros síntomas 11 días después de la inoculación. El análisis de varianza realizado a este periodo de incubación, mostró diferencias altamente significativas (al 1%) entre materiales (Cuadro 2) y (anexo 6A).

El período de incubación fue 11 días más corto en el caso de "Gran Enano" que lo reportado por Mourichon *et al.*(1987), para el mismo cultivar inoculado con conidio en invernadero. Posiblemente el tiempo de humedad saturante después de la inoculación a que fueron sometidas las plantas podría parcialmente explicar esta diferencia, pues estos autores reportan tres días de humedad 100%, frente a los siete de humedad saturante a que fueron sometidas en este trabajo.

Se deben hacer pruebas en este sentido para determinar con mayor exactitud la influencia de este factor en el acortamiento o alargamiento del período de incubación.

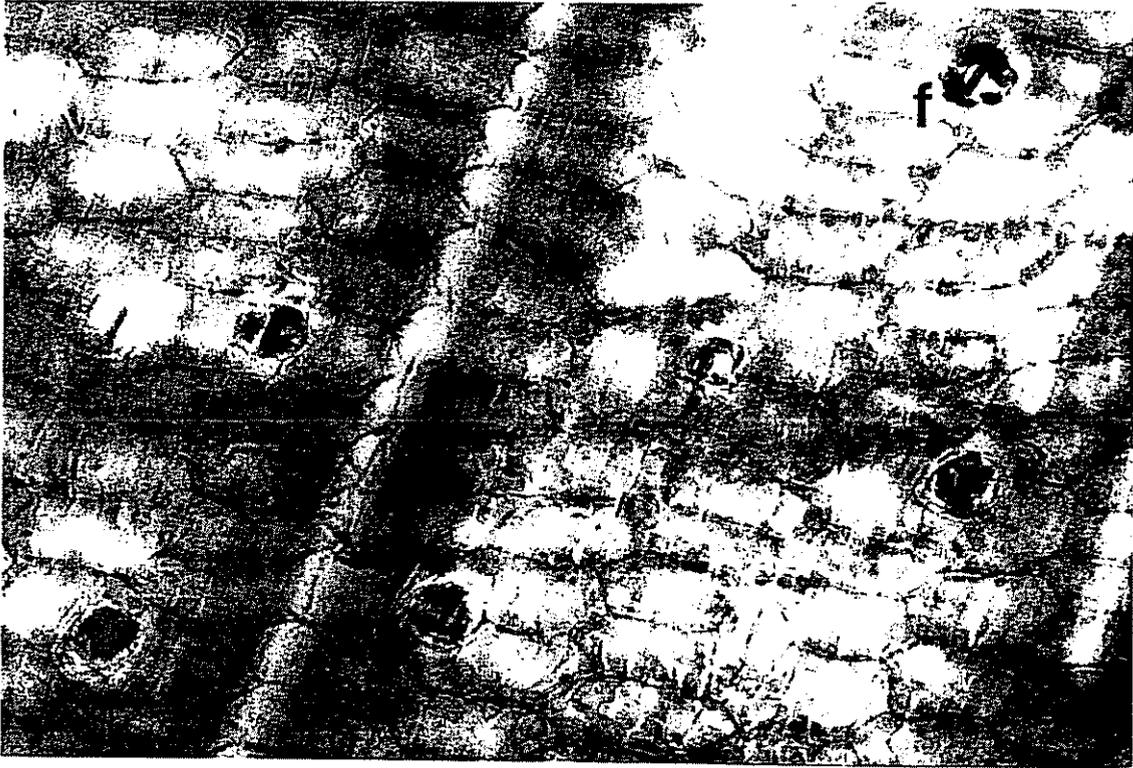


Figura 3 Depósito de fenoles en células oclusivas del clon "Calcuta 4" 24 días después de la inoculación.



Figura 4. Desarrollo de espermatogonios y conidióforos en el cultivar "Gran Enano", 50 días después de inoculación.

Cuadro 2. Promedio de las variables epidemiológicas evaluadas sobre vitroplantas de *Musa sp.* en invernadero, utilizando conidios de *M. fijiensis*.

Clon	Variables Epidemiológicas		
	Pi	Pe	Pd (días)*
Gran enano	7.8 a	24.0	32.0
Calcuta 4	10.6 b	- <sup>1</sup>	-

<sup>1</sup> bloqueo al estado 1 o 3.

\* Medias con igual letra no difieren al 0.1% según la prueba de DMS

El período de evolución (Pe) de la enfermedad, que comprende el tiempo transcurrido desde la aparición del primer síntoma y el estado 6 de mancha, lo alcanzó el cultivar "Gran Enano" a los 24 días; sin embargo en "Calcuta 4" se produjo una detención en la evolución de los síntomas; la lesión más avanzada correspondió a un estado 3 (manchas alargadas y ensanchadas) o un estado 1 (pizcas), en el caso de hojas más jóvenes completamente desarrolladas. Por esta razón no se pudo realizar análisis estadístico. Sin embargo el comportamiento de "Calcuta 4", revela su alta resistencia a la enfermedad.

El período de desarrollo (Pd) fue también diferente, entre ambos materiales; el Cuadro 2, muestra el tiempo total que requirió cada material para alcanzar el máximo grado de desarrollo de la enfermedad. El clon "Calcuta 4" no alcanzó el estado 6 de la enfermedad en los 50 días de evaluación.

En el cultivar "Gran Enano" las lesiones comenzaron a abarcar toda la hoja, produciéndose la muerte total de la misma a los 50 días.

#### 4.2. Análisis histológico de las hojas inoculadas con conidios.

A los 12 días se encontró en el clon "Calcuta 4" una acumulación de compuestos fenólicos en células oclusivas. A medida que avanzó el desarrollo de la lesión, aumentó la cantidad de fenoles hasta los 30 días. Para los 40 y 50 días de muestreo no se encontró diferencias con respecto al muestreo anterior. En este clon se observó en ocasiones, pequeñas concentraciones de compuestos fenólicos en células epidérmicas. No obstante la principal reacción se localizó a nivel de las células oclusivas. Es importante mencionar que se observó germinación de conidios a partir de los 12 días después de la inoculación, en ocasiones dicho tubos germinativos penetraron a través de las células estomáticas

En el cultivar "Gran Enano" a los 12 días se observaron pequeñas acumulaciones de compuestos fenólicos en células epidérmicas. Además se observó muchos conidios germinados sobre la superficie inoculada.

A los 20 y 30 días hubo acumulación de fenoles en células epidérmicas y células que se localizan paralelas al tejido vascular (laticíferos). Esta acumulación aumentó conforme transcurrió el tiempo de muestreo. A los 40 días se pudo observar una zona bien delimitada con depósito de compuestos fenólicos en la parte inoculada mientras que la parte sana permanece igual al testigo sin inoculación.

A los 50 días la evaluación microscópica reveló el desarrollo de gran cantidad de estructuras reproductivas identificadas como conidióforos, y posteriormente espermogonios saliendo de los estomas de las áreas afectadas (Fig.4).

En ninguno de los períodos de evaluación del cultivar "Gran Enano" se encontró acumulación de compuestos fenólicos en células oclusivas, lo que pone de manifiesto una diferencia de reacción entre los materiales "Calcuta 4" y "Gran Enano".

El hecho de haber resultado todas las variables epidemiológicas significativamente diferentes, sugiere la existencia de diferencia entre ambos materiales, respecto al grado de sensibilidad a *M. fijiensis*.

El bloqueo al estado 2, ocurrido a los 24 días sobre el clon "Calcuta 4" sugiere una reacción de hipersensibilidad a la enfermedad, la cual se caracterizó por la acumulación de fenoles sobre las células oclusivas. por la evaluación histológica hecha al día siguiente de la aparición de los primeros síntomas, se pudo determinar una respuesta casi inmediata (caracterizada por la acumulación de fenoles) a la penetración del micelio.

Este resultado concuerda con Keen (1992), quien anota que la hipersensibilidad es un mecanismo activo de defensa que se caracteriza por la muerte rápida de las células del patógeno más proximas al micelio del hongo poco después de la penetración.

Para Anderson (1989), la reacción de hipersensibilidad se inscribe en el tipo de relación hospedero-patógeno incompatible y es casi siempre inducida por elicitores producidos por el hongo o por el vegetal, siendo capaz de inducir un conjunto de modificaciones celulares, tales como: barreras citológicas, producción de etileno y de moléculas que atacan al hongo, liberación de electrolitos y de enzimas hidrolíticas.

#### 4.3. Evaluación de la actividad biológica o tóxica del extracto crudo de *M. fijiensis*.

##### 4.3.1. Obtención del inóculo del hongo y crecimiento en medio líquido.

De nueve aislamientos de tejido foliar necrosado por la enfermedad, se obtuvo igual número de cultivos monospóricos, denominados como 001, 002, 003, 004, 005, 006, 007, 008 y 0010; los cuales tuvieron un gran crecimiento en 10 días de cultivo en Mycophyl-Agua y una buena producción de conidios sobre el medio V-8, en 14 días.

Cuatro semanas después se obtuvo la formación de compuestos fitotóxicos en el medio M-1-D que contenía los discos de 1 cm<sup>2</sup> de cepa del hongo con micelio y conidio.

##### 4.3.2. Obtención del extracto crudo de *M. fijiensis*.

Se obtuvo un litro del filtrado de 250 ml del medio M-1-D contenido en cada uno de los cuatro erlenmeyer, tanto del medio inoculado como testigo.

El medio inoculado se diferenció del testigo por presentar una coloración amarilla más oscura y por la mayor producción de espumas durante la filtración.

Problemas iniciales presentados con la utilización del rotaevaporador y con la misma metodología de dilución del extracto ocasionaron el uso de elevadas temperaturas (mayores de 70 °C) por espacio de hasta 6 horas y un pH del extracto diluido superior a 11.

Las altas temperaturas indujeron la precipitación del medio M-1-D inoculado, similar a la que se observa cuando hay desnaturalización de proteínas; y cambio de coloración, pasando de amarillo a color pardo.

Las pruebas biológicas sobre hojas de "Calcuta 4" y "Gran Enano" usando 20  $\mu$ l; de estas extracciones diluidas en carbonato de sodio al 0.5% más 2 ml de metanol no mostraron ninguna selectividad observandose siempre grandes áreas quemadas en dichos clones en el lugar en que se colocó el extracto. El uso del metanol como testigo no causó ninguna lesión, sin embargo si hubo grandes áreas quemadas en las heridas inoculadas con carbonato de sodio al 0.5%.

Cuando se ajustó a 7 el pH de este extracto diluido, no se observó ninguna reacción en las pruebas sobre heridas en las hojas de ambos clones.

Con el fin de mejorar la calidad del extracto, se procedió a la aplicación de una fina capa de pasta de vacío en todas las uniones del equipo de rotaevaporación. Así se logró evaporar las muestras a 40 °C en poco más de una hora y no se observó ninguna precipitación ni cambios en la coloración de las muestras inoculadas.

El extracto final tanto del medio M-1-D inoculado como del testigo fue una sustancia color pardo rojizo a pardo oscuro, adherida a las paredes del tubo previamente pesado.

Después de la dilución del extracto en carbonato de sodio al 0.5% y fosfato monobásico 0.1 M., se procedió a otra prueba de inoculación. El uso del extracto inoculado sobre las hojas, indujo la formación de áreas necróticas alrededor de la herida en los clones susceptibles de *Musa*. El uso del

carbonato de sodio al 0.5% y el fosfato monobásico 0.1 M, como testigo no causaron ningún tipo de lesión o su efecto fue muy bajo (anexo 7); lo mismo ocurrió con el extracto del medio M-1-D (anexo 8).

#### 4.3.3. Pruebas preliminares usando el extracto crudo de *M. fijiensis* sobre hojas de vitroplantas.

Las pruebas preliminares sobre *Musa sp.* utilizando muestra de cada uno de los pasos del proceso de obtención del extracto crudo mostraron los siguientes resultados: cuando se usó el filtrado (1<sup>er</sup> paso) tanto del medio testigo como inoculado en oscuridad parcial e invernadero sobre hojas, se observó reacción al filtrado que contenía las toxinas, sobre todo en el clon "Gran Enano". Como el medio M-1-D contiene azúcar (30 g/l.), las áreas inoculadas tanto con el filtrado testigo como con el filtrado tóxico, fueron rápidamente colonizadas por hongos saprófitos. A las 48 horas todas las heridas estaban colonizadas. Utilizando microscopio se pudo identificar estructuras de *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.*

Las inoculaciones realizadas con el filtrado evaporado (2<sup>do</sup> paso) tanto del testigo como del inóculo, fueron similares al anterior. Las lesiones en hojas mantenidas en incubadora con oscuridad parcial (a 21 °C a la oscuridad y 28 °C a la luz), fueron colonizadas también por hongos saprófitos.

Cuando se probó el extracto evaporado de los medios M-1-D testigo e inoculado más acetato de etilo (3<sup>er</sup> paso), no se observó ninguna contaminación de las heridas en ninguna de las condiciones ambientales, pero no fue posible distinguir diferencias de comportamiento entre los clones "Gran Enano" y "Calcuta 4", al presentar el mismo tipo de lesiones, aunque

el uso de acetato de etilo como testigo no produjo reacción alguna sobre las heridas, puede ser debido al valor muy bajo de pH (3.5) que contenía el medio M-1-D.

La mayor actividad biológica de cada uno de los pasos del proceso de obtención del extracto, así como del extracto crudo final se observó en condiciones de alternancia de luz tanto en incubadora como en el invernadero. En condiciones de oscuridad, no fue posible identificar el clon susceptible debido a la falta de actividad del extracto.

Este resultado concuerda con lo informado por Lepoivre (1990) quien al hacer inoculaciones del concentrado M-1-D sobre hojas de los cultivares "Fougamou", "Yangambí" y "Gran Enano" colocadas a la oscuridad, no observó ninguna reacción excepto en el clon "Yangambí".

Se ha propuesto en diferentes trabajos que el efecto principal de las toxinas está en la acción que ejerce sobre las mitocondrias, la membrana plásmica, las enzimas, algunos reguladores de crecimiento, así como sobre la fotosíntesis y fotorespiración. En este caso, parece ser que el blanco preferido son los cloroplastos, donde produce inhibición de la fotosíntesis (Misaghi, 1982; Kohmoto y Otani, 1991; Buiatti e Ingram, 1991).

El hecho de que las plantas inoculadas con extracto crudo y colocadas en oscuridad no desarrollaran lesión a diferencia de los colocados bajo luz, puede deberse al hecho de que el extracto fitotóxico no pudiera ejercer su acción sobre el proceso fotosintético, sin embargo, faltan pruebas que nos permitan asegurar esta hipótesis, por tanto sería

recomendable realizar otro tipo de trabajo donde se pueda comprobar el lugar de acción primaria del extracto crudo de *M. fijiensis*.

Otro resultado importante obtenido en estas pruebas es la posibilidad de realizar evaluaciones de esta naturaleza, independientemente de que la hoja esté unida o separada de la planta, ya que en ambas se puede medir el grado de resistencia o susceptibilidad al extracto crudo de *M. fijiensis*. Por otro lado, las inoculaciones realizadas sobre el haz o el envés de las hojas tampoco mostraron diferencias.

#### 4.3.4. Evaluación del extracto crudo sobre hojas de *Musa sp.* en incubadora con alternancia de luz.

Después de los resultados obtenidos en las pruebas preliminares se escogió realizar las siguientes pruebas usando el extracto final con inoculación en el envés y alternancia de luz y oscuridad.

Los resultados obtenidos en la primera prueba de inoculación del extracto crudo sobre hojas de seis clones de *Musa* en cuatro períodos de evaluación se presentan en los Cuadros 3, 4 y 5.

Cuadro 3. Total de área foliar necrosada hasta las 96 horas de seis materiales de *Musa sp.* inoculados con el extracto crudo de *M. fijiensis*.

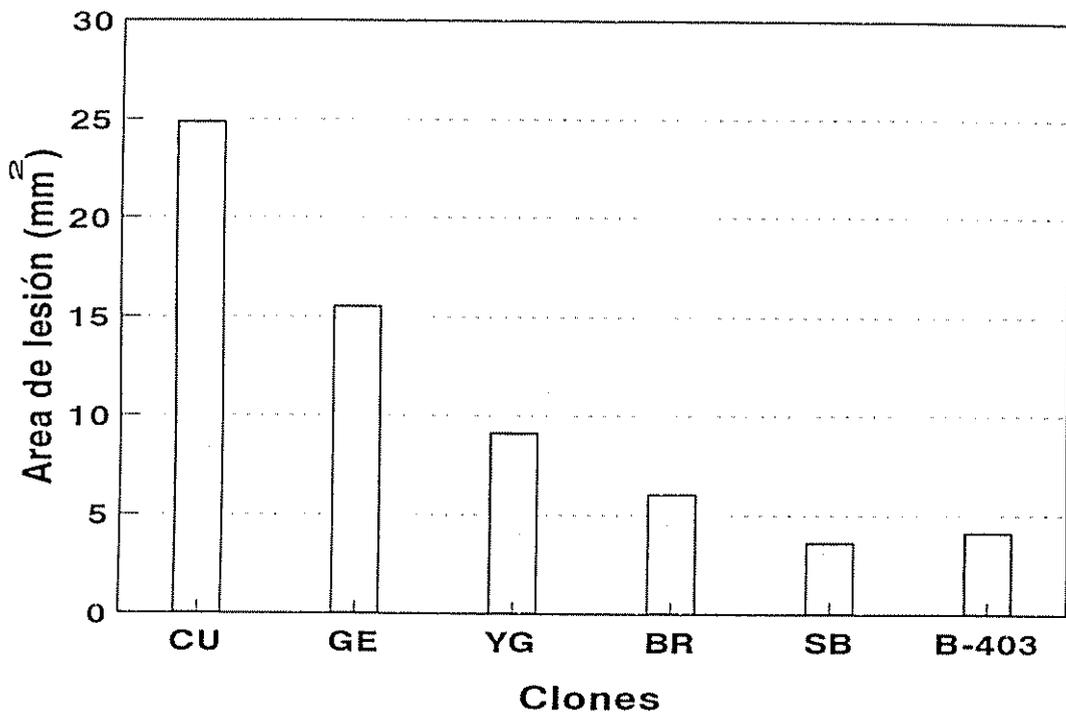
Clon	Genoma	Area en mm <sup>2</sup> *
Curraré	AAB	24.86 a
Gran Enano	AAA	15.54 b
Yangambi	AAA	9.13 c
Calcuta 4	AA	6.04 d
Saba	ABB	3.63 d
Bras-403	AAAB	4.13 d

\* Medias con letras iguales no difieren al 0.1% según la prueba de Tukey.

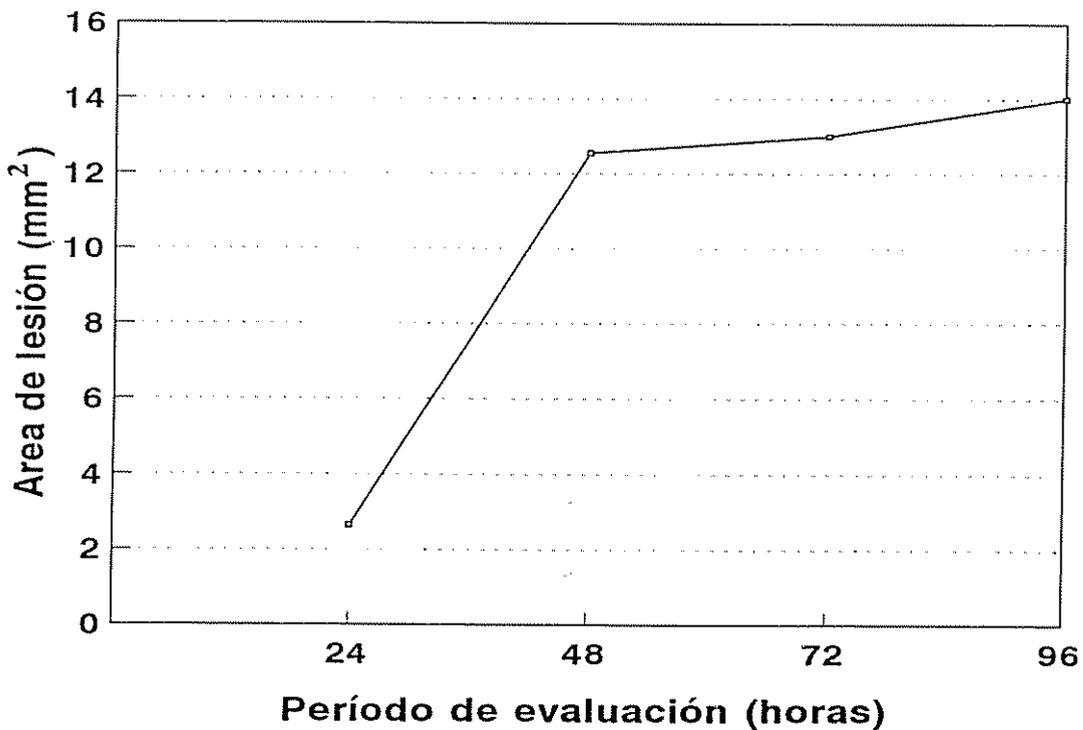
El Cuadro 3, muestra la respuesta diferencial de los materiales evaluados al extracto crudo. El material con mayor área afectada fue Curraré, resultando significativamente más alto que el ocurrido en los de más materiales. El clon menos afectado fue el Saba (Fig.5).

Resultados similares fueron obtenidos por Stierle *et al.* (1991) quienes encontraron que la mayor sensibilidad la mostró el clon con genoma AAB seguido del cultivar "Gran Enano" (AAA), el clon diploide (AA), presentó una resistencia parcial al extracto; mientras que el clon "Saba" (ABB) resultó ser el menos sensible al igual que el híbrido de *M. a. Burmannica* el IV-9.

Molina y Krausz (1989), probaron el extracto crudo sobre hojas de siete cultivares de *Musa sp.*, encontrando al cultivar "Gran Enano" como el más sensible, seguido por el plátano cuerno. Al igual que en los casos anteriores el clon "Saba" fue menos sensible al extracto. Estos resultados ponen de manifiesto la gran susceptibilidad de los plátanos al extracto crudo, confirmando lo planteado por Laville (1983), al anotar que la presencia de un solo genoma B no confiere o



**Fig. 5.** Total de área foliar necrosada hasta la 96 horas, después de la inoculación con el extracto crudo de *M. fijiensis*.



**Fig. 6.** Desarrollo de las lesiones en seis materiales de *Musa* sp. a las 24, 48, 72 y 96 horas, después de la inoculación.

raramente confiere a las variedades mayor resistencia a *M. fijiensis*.

El tiempo en producir la lesión entre los materiales se diferencié estadísticamente entre ellos (Cuadro 4). A las 24 horas se registraron los más bajos valores de área necrosada, sin embargo a las 48 horas las áreas afectadas se incrementaron casi en un 500%. Posteriormente las lesiones no experimentaron ningún aumento significativo (Fig.6).

Cuadro 4. Promedio del desarrollo de lesión en seis materiales de *Musa* durante diferentes periodos de evaluación.

Periodo de evaluación (horas)	Area necrosada mm <sup>2</sup> *
24	2.64 b
48	12.55 a
72	13.01 a
96	14.02 a

\*Medias con letras iguales no difieren al 0.1% Según la prueba de Tukey.

El desarrollo de las lesiones en los seis materiales del Cuadro 1 a través del tiempo, resultó altamente significativo en el análisis estadístico realizado al primer ensayo (Cuadro 5). Se observa que a las 24 horas, el grado de reacción al extracto es nulo para todos los materiales excepto para el cultivar "Curraré". El mayor porcentaje de área afectada lo presentó este cultivar a las 96 horas seguido por el cultivar "Gran Enano". Estos materiales resultaron ser los más sensibles al extracto, observándose una relación positiva con el tiempo ya que a medida que este avanzaba el área de las lesiones fue mayor.

En el resto de los materiales no se observó un avance de la lesión con el transcurso del tiempo, esto significa que el desarrollo de la lesión se inició a las 48 horas después de ponerse en contacto con el extracto y durante las 72 y 96 horas después de realizada la inoculación, no se observaron cambios importantes (Fig.7).

El tiempo mínimo de reacción al extracto y la velocidad de avance de las lesiones son criterios a considerar debido a su estrecha relación con la expresión del grado de resistencia de los cultivares de *Musa*. Este razonamiento se apoya en la literatura y en los resultados obtenidos en este trabajo.

Leal y Maribona (1988), inocularon hojas de variedades susceptibles y resistentes de caña de azúcar (*Sacharum officinarum*), con el extracto crudo de *Helminthosporium sachari*, observando marcada reacción en las variedades altamente susceptibles 48 horas después de la inoculación. Sin embargo en los clones con resistencia se observan síntomas solo 72 horas después de la inoculación.

Stierle *et al.* (1991), refieren que aplicando el extracto tóxico de *M. fijiensis* en hojas de clones susceptibles de *Musa* se obtiene reacción en solo 12 horas.

Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con estos autores, puesto que en el cultivar "Curraré" se indujo grandes y largas lesiones en 24 horas. Estas aumentaron significativamente con el tiempo, en comparación con los materiales menos sensibles "Bras-403" y "Saba" que presentaron pequeñas lesiones 48 horas después, las cuales no avanzaron.

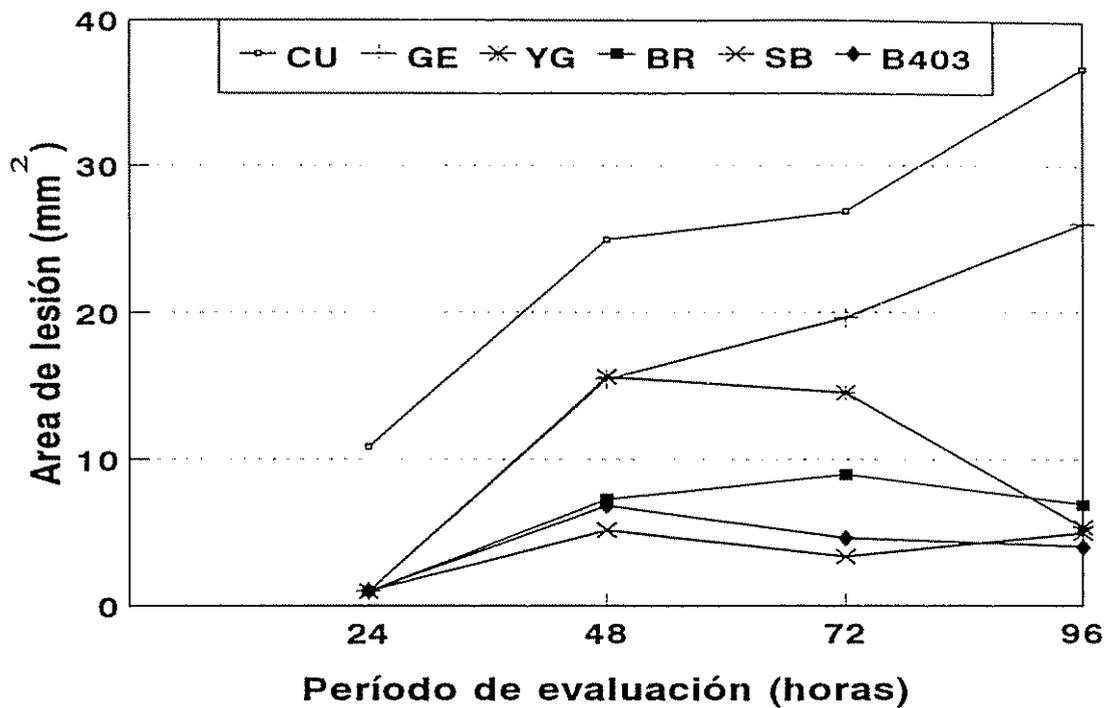


Fig. 7. Promedio del tamaño de las lesiones (mm<sup>2</sup>) de hojas de seis clones de *Musa* sp. evaluados a las 24, 48, 72 y 96 horas, después de la inoculación.

Esta relación del grado de resistencia y el tiempo de reacción al inóculo, también fueron encontrados en pruebas biológicas sobre hojas de uvas de cultivares susceptibles y resistentes, realizadas con fitotóxicas obtenidas a partir del filtrado de cultivo de bacterias fitopatógenas, causante de la enfermedad del taladro de las hojas. En los clones susceptibles el desarrollo de los síntomas se presentaron de 6 a 12 horas después de la inoculación; mientras que en los cultivares resistentes no se presentaron los síntomas hasta las 48 o 72 horas después de inoculadas.

Cuadro 5. Promedio del tamaño de las lesiones (mm<sup>2</sup>) en hojas de seis materiales de *Musa sp.* evaluados en cuatro períodos diferentes. CATIE, Costa Rica, 1995.

Clon	Periodos (horas)			
	24	48	72	96
Curraré	10.85	24.95	26.88	36.78
Gran Enano	1.00	15.45	19.65	26.05
Yangambi	1.00	15.60	14.55	5.37
Burmannicoides	1.00	7.28	8.98	6.92
Saba	1.00	5.17	3.38	4.99
Bras-403	1.00	6.84	4.63	4.04

Aunque en la segunda evaluación de inoculación se observó más reacción al extracto a las 24 horas; el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre ambas inoculaciones (Cuadro 6).

El análisis de varianza de ambas pruebas de inoculación del extracto crudo, no mostró diferencias significativas (Cuadro 6). Las figuras 8 y 9, muestran el comportamiento de los períodos de evaluación y tamaño de las lesiones obtenidos en el análisis. Estos resultados son importantes puesto que demuestra que no hay diferencia entre los extractos usados. Cabe mencionar que desde un inicio se tuvieron ocho extractos

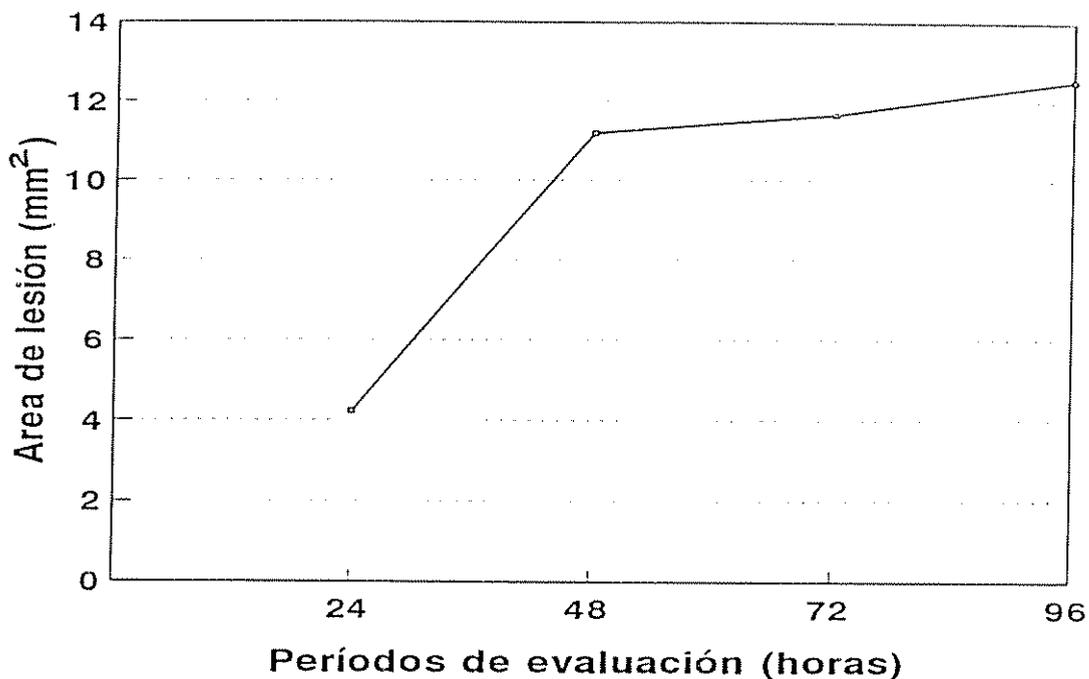


Fig. 8. Promedio del desarrollo de la lesión en seis materiales de *Musa sp.* a las 24, 48, 72 y 96 horas, después de la inoculación. Análisis Combinado.

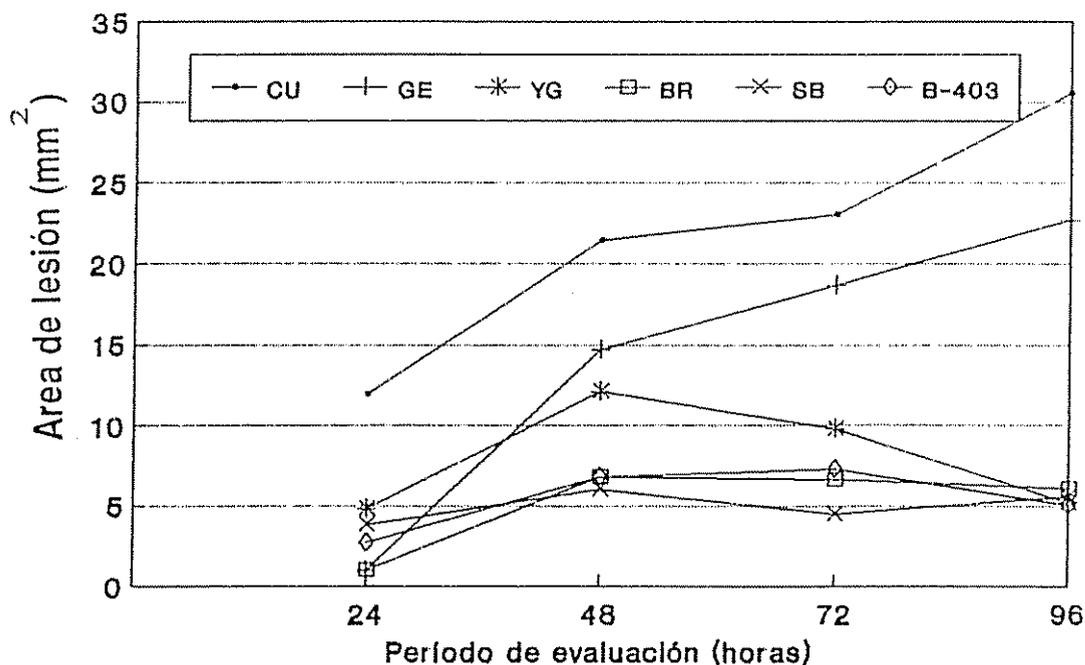


Fig. 9. Promedio del tamaño de las lesiones (mm<sup>2</sup>) de hojas de seis materiales de *Musa sp.* evaluados a las 24, 48, 72 y 96 horas. Análisis combinado.

diferentes provenientes de cultivos monospóricos diferentes. Las limitaciones de tiempo y material vegetal disponible permitieron evaluar únicamente los extractos denominados como 001 y 003. Sin embargo pruebas posteriores realizadas en el invernadero e incubadora utilizando las cepas 007 y 005, demostraron que no existe diferencias entre los diferentes extractos en cuanto a su capacidad para producir los síntomas de la enfermedad y que casi toda la respuesta que se manifiesta (en un 97%) es debida al grado de resistencia de los materiales.

Cuadro 6. Análisis de varianza de las lecturas del tamaño de las lesiones en hojas de seis materiales de *Musa sp.* evaluadas en dos pruebas de inoculación utilizando diferente extracto.

Fuente	G1	Cme	F cal.	Pr > F
Modelo	55	117.60	23.70	0.0001
Error	40	4.96		
Experimento	1		8.34	0.0062
Per. de eval.	3		70.70	0.0001
Exp X per. de eval.	8		10.79	0.0001
Clon	5		149.15	0.0001
Exp.X clon	5		9.60	0.0001
Per.de eval. X clon	15		13.63	0.0001
Exp.X p.de ev.X clon	15		2.62	0.0077

$R^2 = 0.9702$

CV = 22.50

#### 4.3.5. Efecto macroscópicos del extracto crudo sobre las hojas de seis materiales de *Musa*.

Se observó, que en cada material la respuesta al extracto crudo fue diferente y esta variación también fue observada en cada período de evaluación (Cuadro 7). De esta forma, a las 24 horas después de la inoculación, se observó en algunos cultivares que la gota de extracto crudo permanecía aún sobre la superficie de la hoja, mientras que en otros, ya la gota se había distribuido desarrollando

lesiones. Los cultivares más susceptibles ("Curraré" y "Gran Enano"), presentaron un mayor desarrollo de la lesión, el cual continuó hasta las 96 horas. Los clones como "Yangambi" y "Calcuta 4" desarrollaron pequeñas lesiones, lo que revela un comportamiento medianamente resistente, en comparación con el "Saba" y el "Bras-403", donde el desarrollo de las lesiones fue aún menor (Fig.10).

Cuadro 7. Caracterización del extracto crudo en hojas de seis materiales de *Musa* evaluados en cuatro periodos de tiempo.

Clon		Período (horas)			
		24	48	72	96
Curraré	Distribución del extracto necrosis.	Lesiones largas y necrosis 25mm <sup>2</sup> prom.	Lesiones largas y necrosis 27mm <sup>2</sup> prom.	Grandes áreas necrosadas. halo clorótico intenso.	
Gr. Enano	Extracto color pardo sobre la hoja.	Lesiones necrosas de 15mm <sup>2</sup> prom.Halo claro.	Necrosis de 20mm <sup>2</sup> prom.Halo clorótico	Necrosis de 26mm <sup>2</sup> prom.Halo clorótico.	
Yangambi	Distribución sin necrosis	Necrosis de 16mm <sup>2</sup> prom.	Lesiones necrosas, de 15mm <sup>2</sup> prom.Halo claro.	Necrosis de 5mm <sup>2</sup> halo clorótico.	
Calcuta 4	Reacción clara sobre la hoja. No necrosis.	Algo de extracto sobre la hoja. Necrosis de 7mm <sup>2</sup>	Necrosis de 9mm <sup>2</sup> prom.	Necrosis de 7mm <sup>2</sup> prom.Halo clorótico.	
Saba	Reacción rojizo sobre la hoja. No lesión.	Pequeñas necrosis de 5mm <sup>2</sup> . Halo amarillo	Pequeñas necrosis de 3mm <sup>2</sup> prom.Halo amarillo	Pequeñas necrosis de 5mm <sup>2</sup> prom. Largo halo clorótico	
Bras-403	Reacción pardo oscuro sobre la hoja. No lesión.	Pequeñas necrosis de 7mm <sup>2</sup> halo amarillo claro.	Pequeñas necrosis de 5mm <sup>2</sup> prom.Halo amarillo claro.	Pequeñas necrosis de 4mm <sup>2</sup> prom. Halo amarillo claro.	

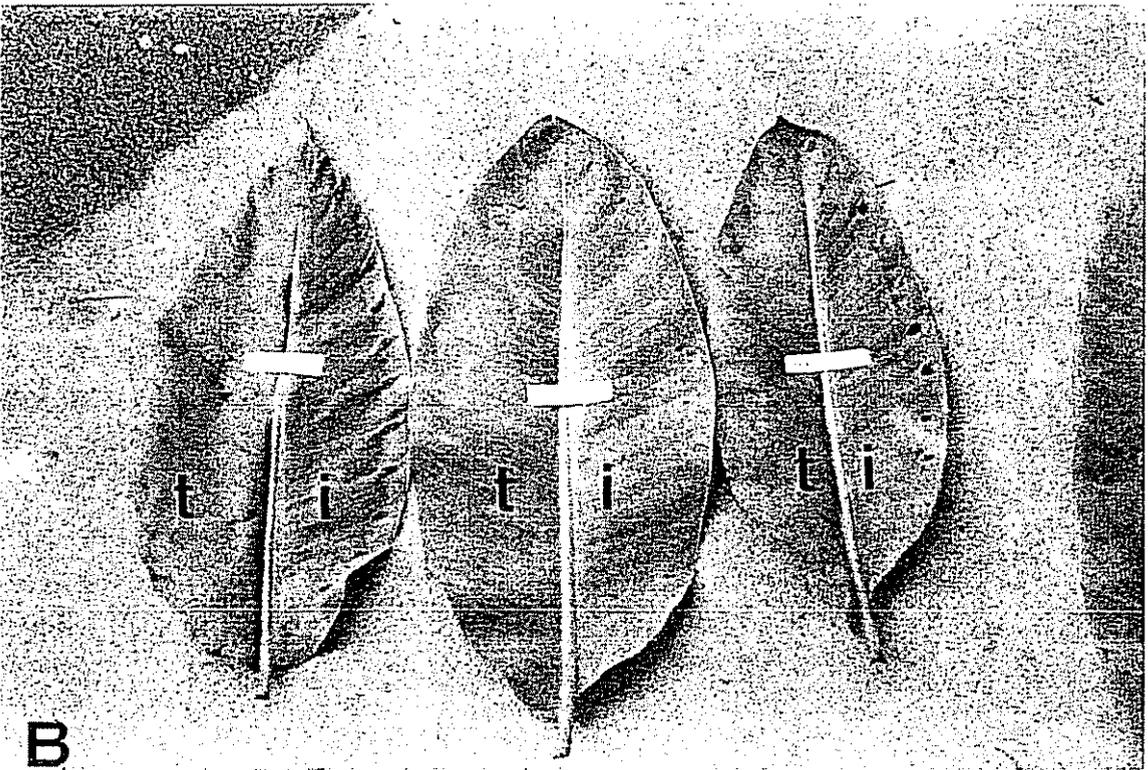
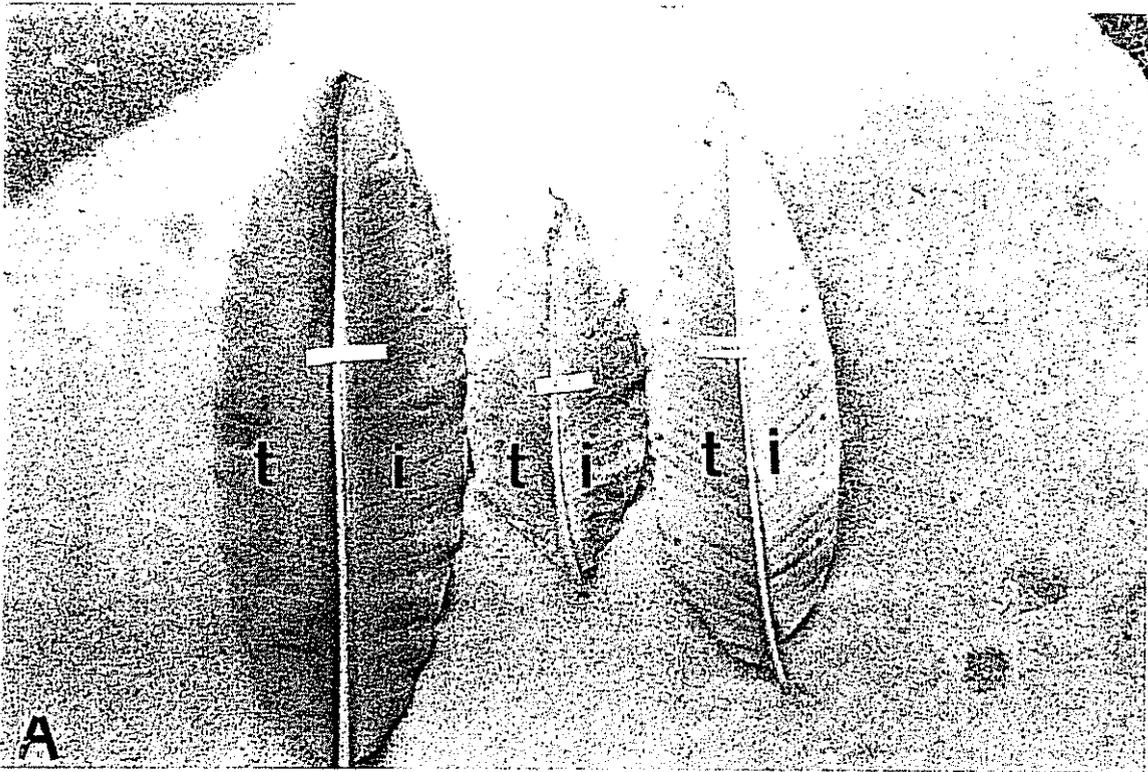


Figura 18. Desarrollo de lesiones en hojas de seis materiales de *Musa* sp. inoculadas con el extracto crudo de *M. fijiensis*

En algunos materiales el efecto del extracto es muy lento; en otros, fue posible observar una fuerte oxidación en el área donde se provocó la herida. No obstante, estas reacciones no se observaron cuando se inoculó el extracto testigo, el cual en casi todos los casos no produjo ningún tipo de lesión sobre las heridas (anexo 8A).

#### 4.3.6. Análisis histológico del efecto de las inoculaciones del extracto crudo sobre hojas.

De los resultados obtenidos en el análisis histológico es importante destacar, que todos los clones utilizados reaccionan positivamente al reactivo de Hoepfner, (para fenoles). Eso significa que todos ellos en forma natural en mayor o menor grado poseen fenoles en sus células epidérmicas o bien en las células del mesófilo. Sin embargo, al hacer la inoculación con el extracto, se observa como la reacción de acumulación de estas sustancias va en aumento, hasta llegar a observarse áreas completamente oscuras caracterizadas por alta acumulación fenólica. En este sentido se destacan los cultivares "Curraré" y "Gran Enano" que fueron los que presentaron mayor acumulación de fenoles seguidos por "Yangambí" y "Calcuta 4" donde se observa un aumento en la acumulación de fenoles conforme aumenta el tiempo de exposición al extracto crudo. Los clones "Saba" y "Bras-403", desarrollaron menos lesiones, mostraron un bajo contenido en fenoles (Figs. 11, 12 y 13).

En todos ellos, los fenoles se acumulan sobre todo en el área donde se produjo la incisión. Sin embargo en los materiales susceptibles no solo hay mayor depósito de fenoles en dicha área, sino que áreas vecinas también son afectadas. La principal reacción ocurre siempre por el envés de la hoja, (quizas por ser el lugar donde se hace la inoculación) donde se aprecian fenoles que varían desde una coloración



Figura 11. Depósito de fencles en los clones "Gran Enano" 4x(A), y "Surraré" 4x(B) a las 66 horas después de la inoculación. Incisión (I), fencles (f).



Figura 13. Depósito de fencles en los clones "Calcuta 4" a 4x(A) y "Yangambi" 4x(B) a las 36 horas de la inoculación. Incisión (I), fencles (f).

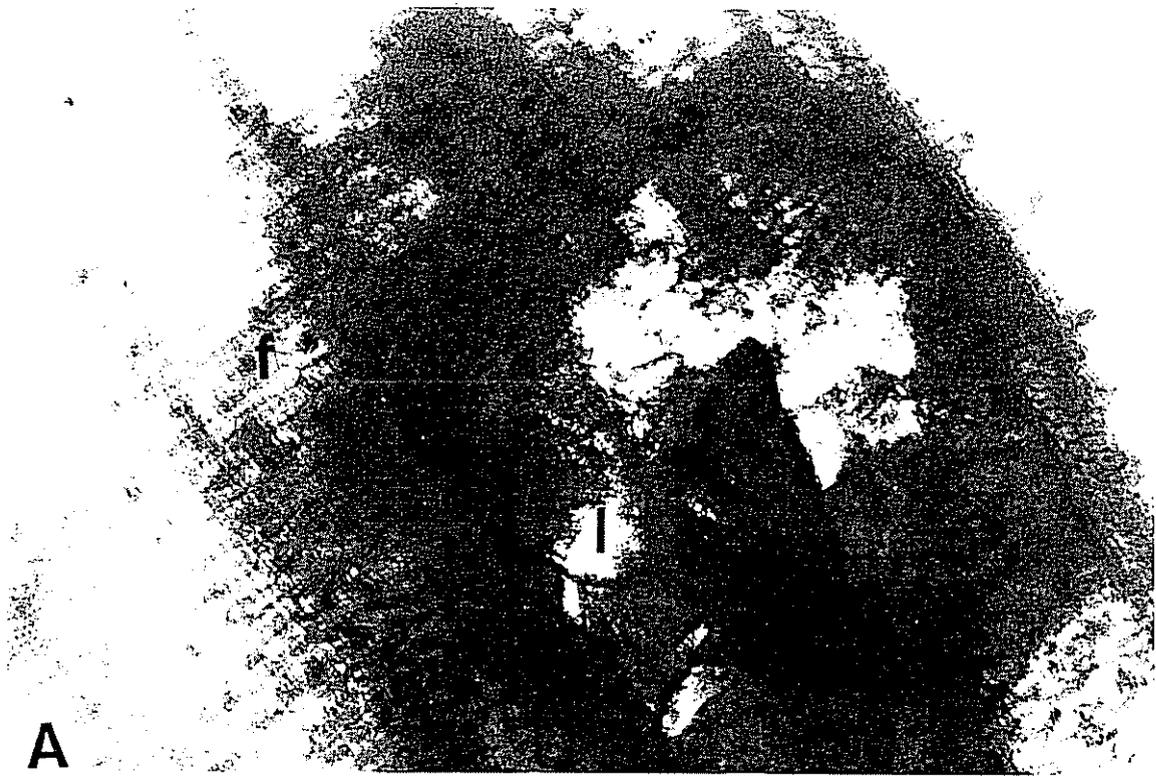


Figura 13. Depósito de fencles en el clon "Saba" 4x(A) y en el híbrido "Embrapa-408" 4x(B) a las 96 después horas de la inoculación. Incisión (I), fencles (f).

pardo claro hasta una coloración casi negra, dependiendo de la acumulación de los mismos y del cultivar (Cuadro 8).

En la cara adaxial, aunque hubo presencia de dichos fenoles su concentración fue más baja. En la misma la mayoría de los materiales, y sobre todo el "Saba" mostraron fenoles de color rojo (Fig.14).

Es importante también destacar que el híbrido "Bras-403" presentó al inicio del período de evaluación (24 y 48 horas), una mayor acumulación de fenoles que a las 72 y 96 horas, debido a una posible reacción inicial por parte de este material, que limitó la acción del extracto cuando penetró más tarde (Fig.15).

Ebel (1986), menciona que la presencia o inducción de compuestos antimicrobianos (fitoalexinas) en el sitio de penetración del patógeno, son mecanismos que confieren resistencia a las plantas. Estos compuestos comprenden diferentes metabolitos secundarios que incluyen isoflavonoides, estilbenos y terpenoides. En el caso de la síntesis inducida de estos compuestos la velocidad y magnitud de su acumulación parecen determinar la resistencia de algunas combinaciones cultivar-hospedero (Bailey y Mansfield, 1982). Trabajos realizados por Beveraggi (1988), mostraron la presencia de estos compuestos antimicrobiano en los cultivares resistentes "Fougamou" y "Yangambí km 5". Sin embargo la respuesta de hipersensibilidad mostrada por "Yangambí km 5" y la poca extensión de la lesión Fougamou, no pudieron explicarse de la misma manera. Se busca según Levin (1976), una respuesta entre la presencia de compuestos fenólicos y la reacción de resistencia y susceptibilidad a diferentes patógenos.

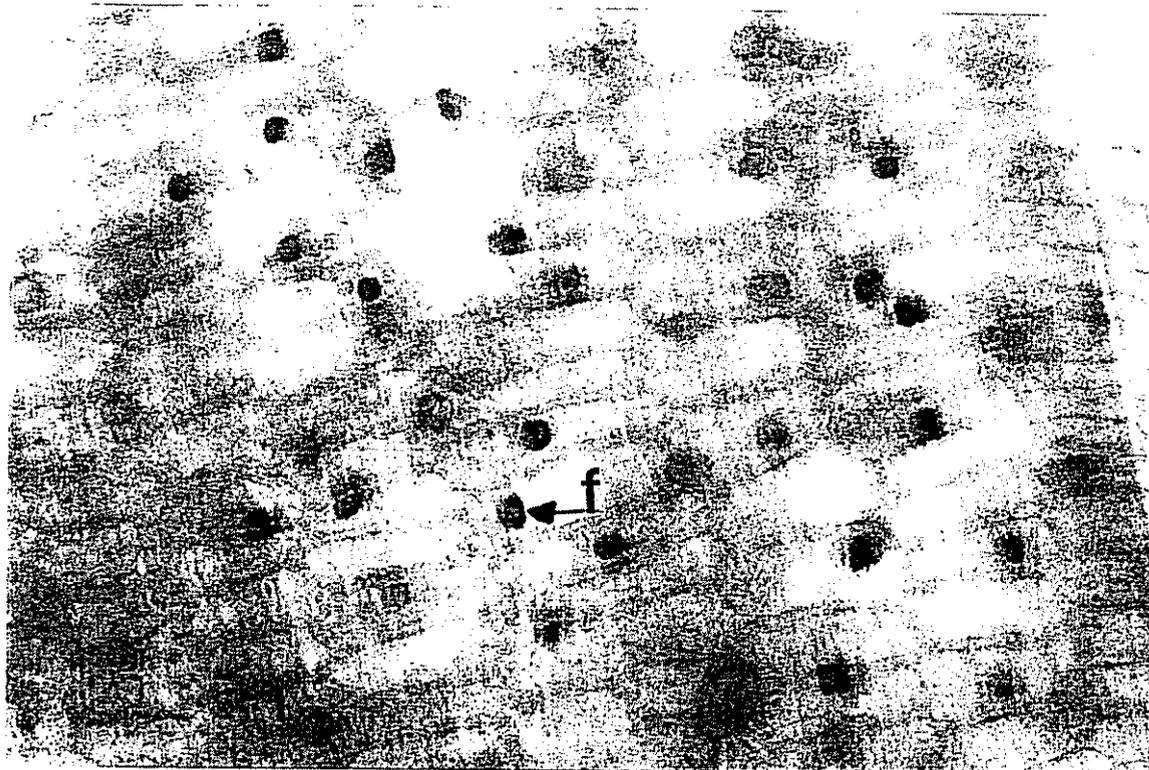


Figura 14. Depósito de fecales de color rojo sobre la superficie adaxial del cíon "Saba".



Figura 15. Depósito de fecales en el cíon "Embrapa-103", 48(A) y 96(B) horas después de la inoculación.

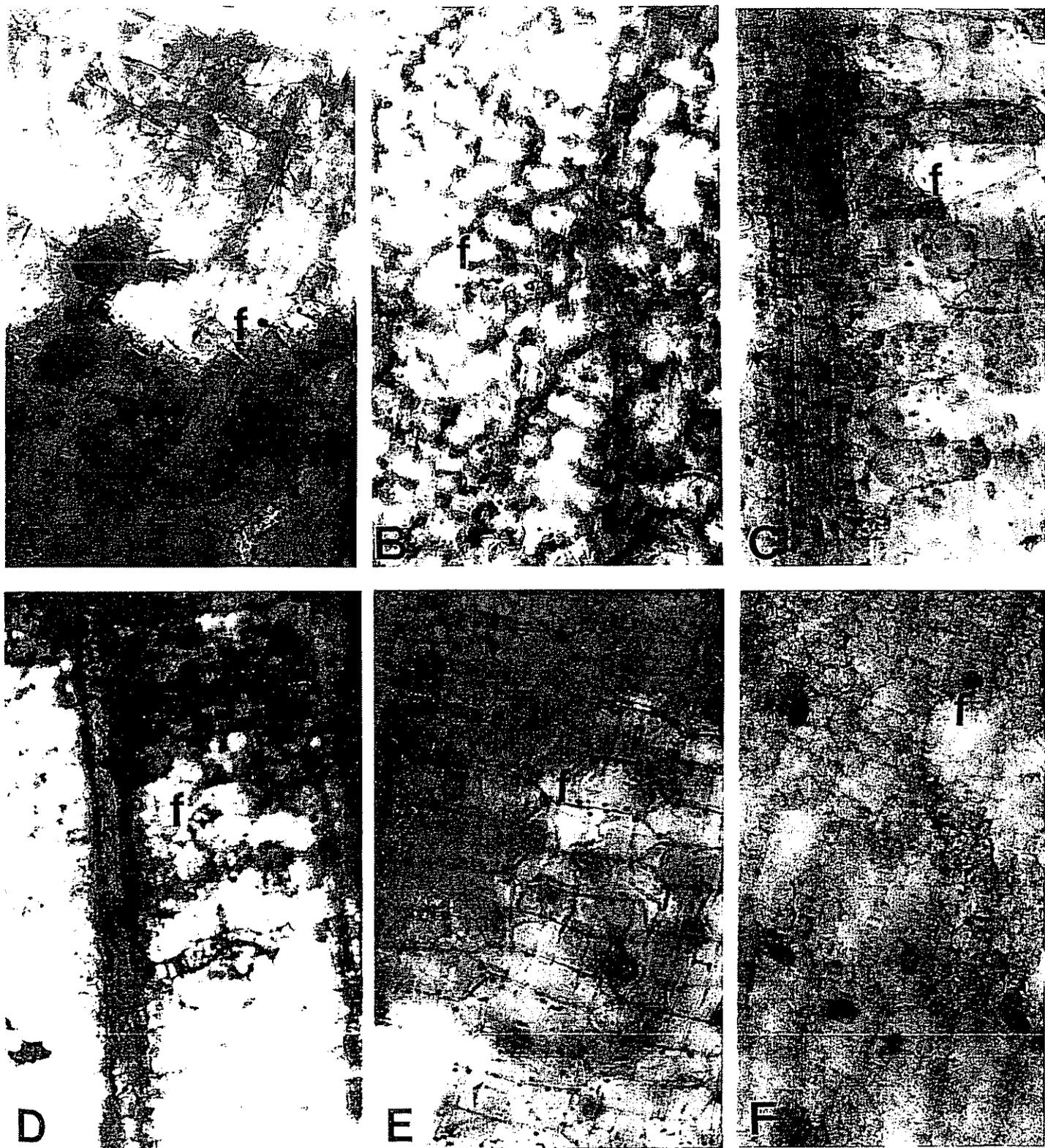


Figura 15. Detalle de Los Fenoles (F) producidos por los cultivares "Gran Espino" (A), "Carraré" (B), "Calcuta" (C), "Langnac" (D), "Faba" (E) y "Embrega-408" (F). 10X.

Los resultados del presente trabajo permite agrupar los cultivares en estudio en tres categorías, de acuerdo a la respuesta que se manifestó con la presencia del extracto crudo. "Gran Enano" y "Curraré" se caracterizaron por su susceptibilidad. "Yangambí" y "Calcuta 4" resultaron menos sensibles. En el caso específico de "Yangambí" se dice que muestran una respuesta de hipersensibilidad debido a la rápida reacción de oscurecimiento y posterior necrosis de las células localizadas en el sitio de infección (Mourichon, 1987; Beveraggi 1993). Dado que "Calcuta 4" mostró una respuesta similar podría caracterizarse como hipersensible. Los materiales "Bras-403" y "Saba" mostraron mayor resistencia.

Los estudios realizados para medir la presencia de fenoles en cada uno de ellos, permitieron observar que a las 24 horas el material más susceptible tenía mayor cantidad de fenoles que los resistentes. Sin embargo a las 48 horas todos los demás materiales presentaron reacción al extracto. Por este hecho se considera importante hacer evaluaciones a menor tiempo (por ejemplo cada 12 horas) después de realizada la inoculación ya que con las evaluaciones anteriores no se pudo determinar cual de ellos reacciona más temprano a la presencia del extracto. Además, de acuerdo con Buiatti e Yngram (1991), la respuesta diferencial al extracto puede depender del grado de diferenciación y del estado fenológico de los materiales usados.

Los cortes histológicos en resina del tejido foliar, sano de los cultivares estudiados, permitieron establecer que casi no existen diferencias en la estructura interna de las hojas de cada uno de los cultivares. De esta manera, se aprecia en todos ellos una epidermis uniseriada compuesta de células pequeñas rectangulares en sección transversal. Internamente se localiza una hipodermis de 1 a 3 capas de células de grosor dependiendo del cultivar. Se observan

además las células del mesófilo de empalizada y mesófilo esponjoso. El tejido vascular se caracteriza por estar rodeado de fibras y asociado con laticíferos. Finalmente, la epidermis abaxial es también uniseriada y es donde se localiza el mayor número de estomas. (Fig.16 y 17).

En algunos de estos clones se aprecian fenoles en las células del mesófilo, sin embargo no siempre los cortes del mismo cultivar muestran las mismas características, lo que dificulta establecer diferencias con respecto a otros cultivares. El grosor de la lamina foliar, va a depender de la región de la hoja en que se tomó la muestra. Sin embargo a pesar de ello podemos observar algunas diferencias en cuanto a tamaño del complejo estomático (células oclusivas y poro), frecuencia de estomas, tamaño de las células del mesófilo en empalizada, así como en la densidad de las células del mesófilo esponjoso. No obstante estos resultados por si solos no nos permiten establecer diferencias entre cultivares susceptibles y resistentes.

El cultivar "Curraré", presenta células largas del mesófilo y acumulación de fenoles en las células que rodean la cavidad subestomática. El cultivar "Gran Enano", se caracterizó por tener en general pocos fenoles (en tejido sano) y cámaras subestomáticas grandes. El clon "Calcuta 4" mostró fenoles a nivel del mesófilo de empalizada en el tejido sano. En "Saba", se encontró la cavidad subestomática más pequeña que en "Curraré" y "Gran Enano", una hipodermis con dos capas de células, mesófilo empalizada con células pequeñas. Se observó poca acumulación de fenoles. El cultivar "Yangambí" mostró en el tejido sano, un mesófilo empalizada con pocas capas de células, hipodermis de una capa de células de grosor, una pequeña acumulación de fenoles cercanos al tejido vascular.

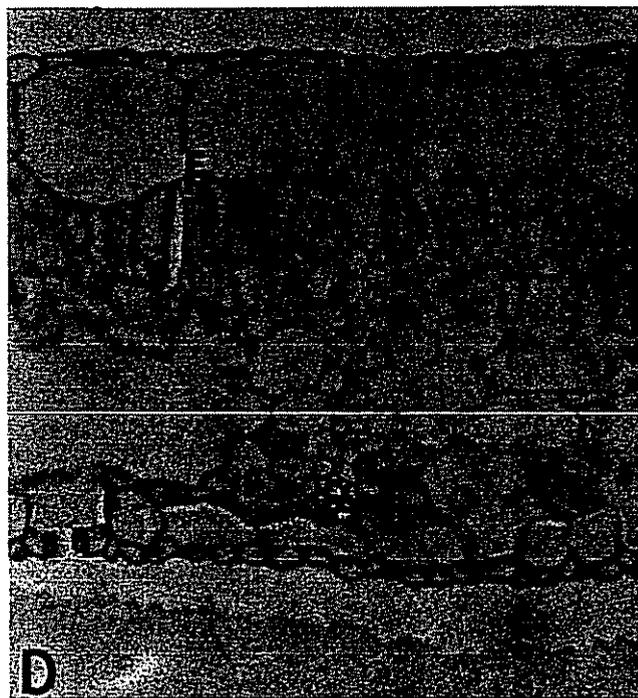
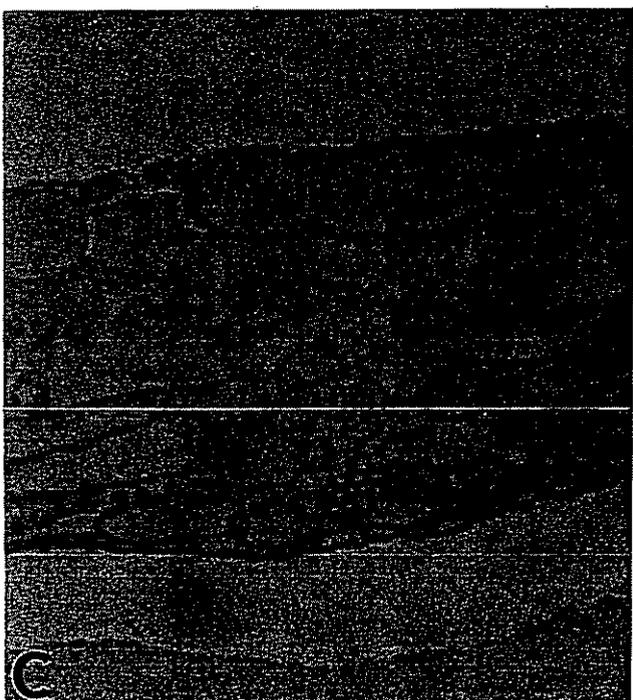
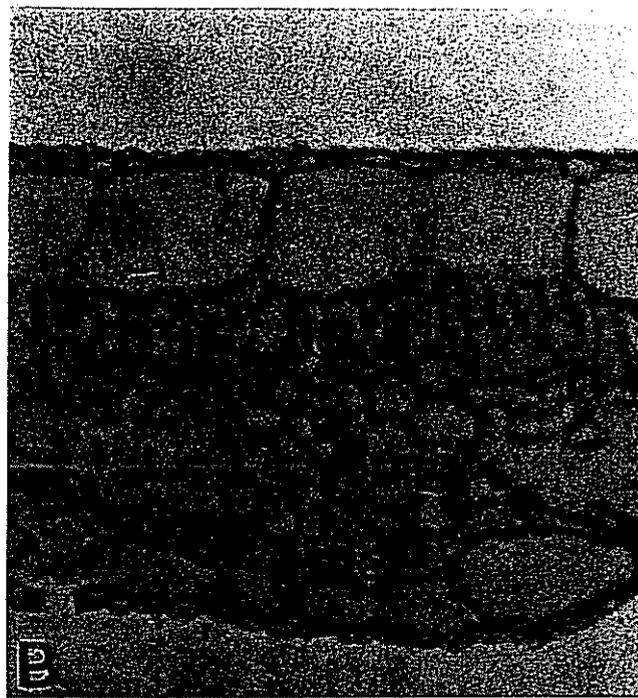
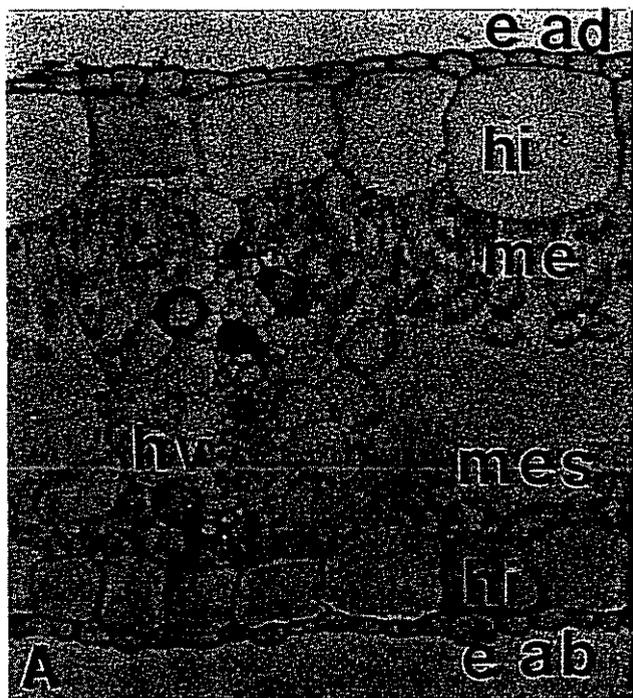


Figura 16. Sección transversal de la hoja de los cultivares "Gran Enano" (A) "Curraré" (B) "Yangambí" (C) y el clon "Calcuta 4". Obsérvese fenoles en células del mesófilo. Epidermis adaxial (e ad), hipodermis (hi), mesófilo de empalizada (me), haz vascular (hv), mesófilo esponjoso (mes), epidermis abaxial (e ab), fenoles (f).

En todos los cultivares la muestra inoculada se caracterizó por una gran acumulación de fenoles en el área de la lesión, sin embargo el deterioro y maceración de dicha área no permitió hacer estudios más profundos (Fig.18).

Cuadro 8. Acumulación de compuestos fenólicos de las áreas foliares inoculadas con el extracto crudo durante el período de evaluación.

Clon	Acumulación en los períodos de evaluación (horas)*			
	24	48	72	96
Curraré	++	+++	+++	+++
Gran enano	+	++	+++	+++
Yangambí	+	+	++	++
Calcuta 4	+	+	+	++
Saba	-	+	+	+
Bras-403	++	++	+	+

\* Acumulación de compuestos fenólicos.

- No acumulación

+ baja acumulación de fenoles.

++ Alta

+++ Muy alta

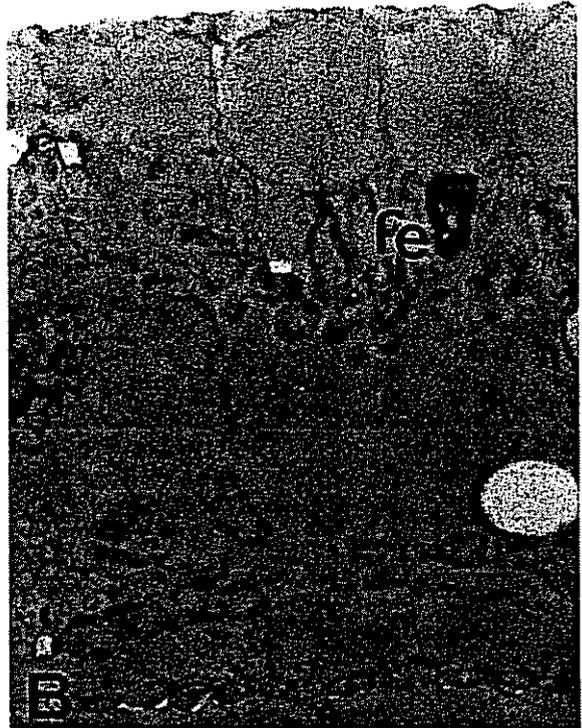
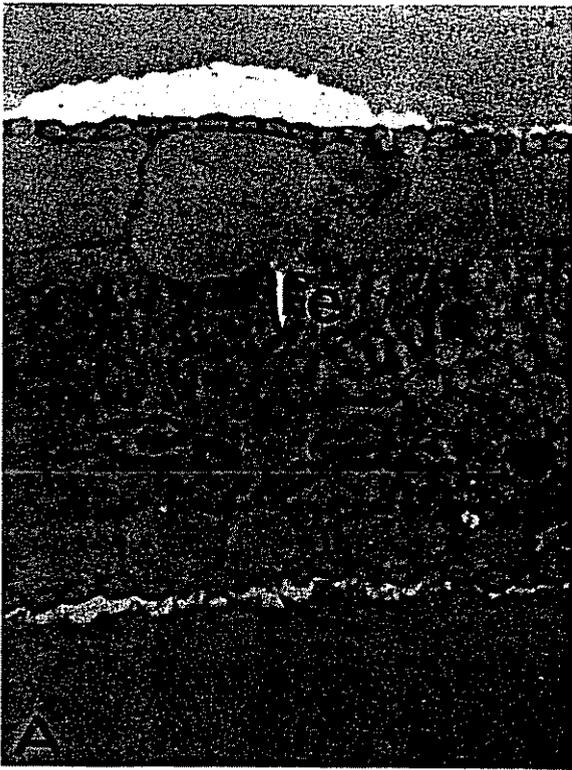


Figura 17. Sección transversal de hojas de "Saba" (A) y "Embrapa-403" (B) observese fenoles (fe) en células del mesófilo.

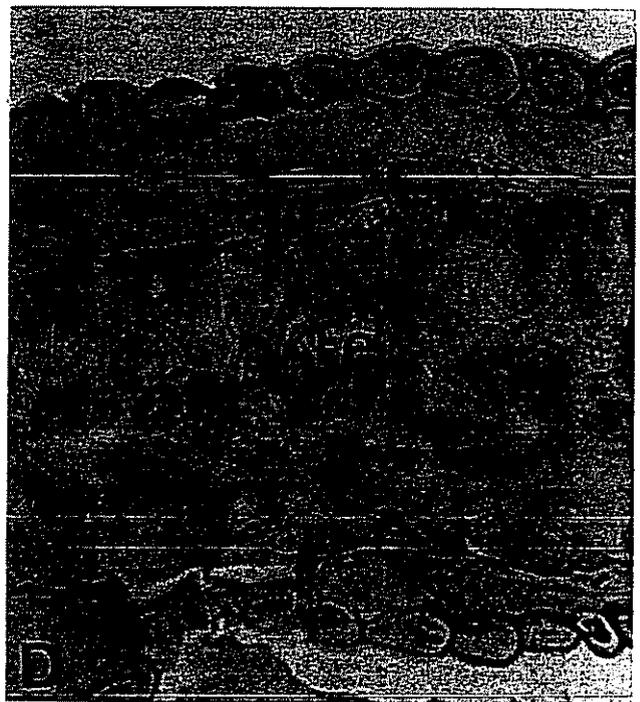


Figura 18. Sección transversal de hojas de "Gran Enano" (C), y "Curraré" (D), con tejido macerado por inoculación con extracto crudo.

#### 4.4. Evaluación de resistencia *in vitro* utilizando el extracto crudo de *M. fijiensis* sobre callos de *Musa sp.*

##### 4.4.1. Obtención del material *in vitro* para la prueba de identificación.

La formación de callos en "Gran Enano" se observó a partir de los cinco meses de sembradas las inflorescencia masculinas en el medio M.S. modificado (MA<sub>1</sub>). Para la formación de embriones se transfirió al medio M.S. modificado (MA<sub>2</sub>). En el caso de "Calcuta 4" la formación de callo se comenzó a observar después de cuatro semanas de sembrados los embriones cigóticos en el medio con 2 mg/l de Picloram y 60 g de sacarosa. Tres semanas después se indujo la formación de embriones al transferirlos al medio con 0.5 mg/l de Picloram y 30 g/l de sacarosa.

##### 4.4.2. Prueba de identificación de resistencia *in vitro* utilizando callos de *Musa sp.*

Las dosis utilizadas de 20, 40 y 100 µg. de extracto crudo de *M. fijiensis*, no indujo ningún daño sobre los callos de "Gran Enano" y "Calcuta 4" durante las dos semanas de exposición al mismo.

Cuando se usó dosis más altas de 200, 400 y 600 µg de extracto por 2 ml de medio hubo reacción a los tres días de su exposición al extracto. La reacción se presentó en callos del cultivar "Gran Enano", en todos los tratamientos con extracto, diferenciándose solo por la intensidad de la misma (Fig.19).

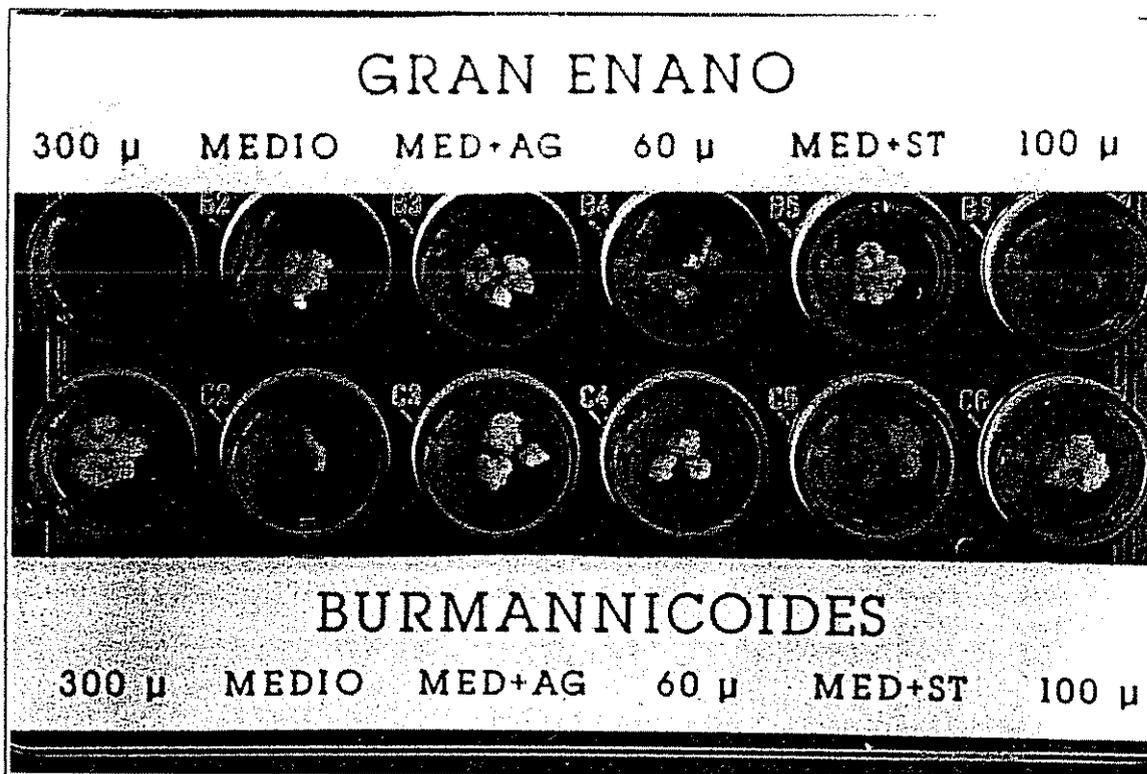


Figura 19. Reacción de callos de Gran Enano y *Burmannicoides* a la presencia de extracto crudo de *M. fijiensis*, 14 días a la inoculación. CATIE, Costa Rica, 1994.

Leyenda:

- B<sub>1</sub> y C<sub>1</sub>: 300 $\mu$ l del extracto crudo.
- B<sub>2</sub> y C<sub>2</sub>: Medios M.S.(MA<sub>2</sub>) y M.S.(P<sub>10.5</sub>).
- B<sub>3</sub> y C<sub>3</sub>: Medios M.S.(MA<sub>2</sub>) más agua y M.S.(P<sub>10.5</sub>) más agua.
- B<sub>4</sub> y C<sub>4</sub>: 60 $\mu$ l del extracto crudo.
- B<sub>5</sub> y C<sub>5</sub>: Medios M.S.(MA<sub>2</sub>) más extracto testigo y M.S.(P<sub>10.5</sub>) más extracto testigo.
- B<sub>6</sub> y C<sub>6</sub>: 100 $\mu$ l del extracto crudo.

Los resultados de la prueba usando 100, 120, 140, 160 y 180  $\mu\text{g}$  por 2 ml de medio, reveló reacción de los callos del cultivar "Gran Enano" expuestos a partir de los 120  $\mu\text{l}$ , tres días después de su colocación. Nuevamente no se observó ninguna reacción al usar dosis de 100  $\mu\text{g}$  por 2 ml de medio.

La reacción al extracto se caracterizó por una coloración azul oscuro en el área del callo más próxima al medio con extracto. Con el paso de los días se tornó de color negro, abarcando inclusive áreas no expuestas al medio. Se observó que a mayor concentración del extracto éstas reacciones fueron más intensas y más rápidas en su avance.

En el clon "Calcuta 4" no se observó la reacción ocurrida en "Gran Enano", lo que pone en evidencia su mayor grado de resistencia al extracto crudo. Sin embargo el uso de concentraciones de 400 y 600  $\mu\text{g}/2$  ml de medio, favorecieron la oxidación de los callos (Cuadro 9), lo que fue observado en la dos primeras semanas de iniciada la prueba.

En los tratamientos testigo de ambos materiales no se observó reacción; en ellos los callos continuaron creciendo libremente y produciendo en algunos casos gran cantidad de embriones.

Cuadro 9. Respuesta de los callos de "Gran Enano" y "Calcuta 4" a la inoculación del extracto crudo de *M. fijiensis*.

TRATAMIENTO	50µl		60µl		70µl		80µl		90µl		100µl		200µl		300µl	
RESPUESTA	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R
GRAN ENANO	12	0	4	8	4	8	2	10	2	10	2	10	1	11	0	12
PROB DE R.	.0002		.985		.985'		.999		.999		.999		1.000		1.000	
CALCUTA 4.	12	0	11	1	10	2	10	2	10	2	10	2	6	6	2	10
PROB DE R.	.0002		.003		.019		.019		.019		.019		.390		.999	

N= No reacción.

R= reacción.

50 µl= 100 µg de extracto crudo

60 µl= 120 µg de extracto crudo

200 µl= 400 µg de extracto crudo

300 µl= 600 µg de extracto crudo.

De acuerdo con el Cuadro 9, en callos del cultivar "Gran Enano" la probabilidad de obtener reacción al extracto usando 60 µl es 0.9847, si comparamos este resultado con la concentraciones superiores, podemos observar que aunque la probabilidad de reacción aumenta con la concentración, la diferencia con respecto a 60 µl es mínima. La probabilidad de inocular 50 µl y obtener reacción es muy baja.

En "Calcuta 4", se observa un tipo de reacción diferente (oxidación) a la ocurrida en "Gran Enano", que se caracterizó por una coloración pardo oscuro que aumentó en intensidad a medida que aumentó la concentración del extracto.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las demás pruebas utilizando estos dos materiales, en cuanto a su grado de resistencia a *M. fijiensis*. Este comportamiento de los cultivos de callos frente al extracto crudo, pone en evidencia el grado de resistencia diferencial que presentan

ambos materiales, confirmando lo sugerido por Evans *et al.* (1983), quien anota que las características de resistencia que se expresan en callos podrían ser los mismos que se expresan a nivel de la planta, lo que permite desarrollar sistemas de selección *in vitro* con relación a este carácter.

#### 4.5 Análisis histológico de la reacción de los callos de "Gran Enano" y "Calcuta 4" al extracto crudo de *M. fijiensis*.

El efecto del extracto sobre los callos de "Gran Enano" fue mayor al aumentar su concentración y el período de muestreo. Este efecto se pudo observar por el mayor o menor número de capas de células en la periferia del callo.

Al usar la dosis de 60  $\mu$ l, se observó el inicio de la lesión que se caracterizó por un leve deterioro de las células más externas que conforman el callo. Estas empiezan a mostrar la maceración de las paredes celulares, así como un citoplasma muy denso de color grisáceo en contraposición con el citoplasma de las células sanas que es de color verde. Los estudios al microscopio de luz no permiten observar un daño a nivel de núcleo.

Los daños anteriores van en aumento al usar las dosis de 70, 80 y 90  $\mu$ l. A los 100  $\mu$ l las paredes de las células dañadas tiñen de rojo con la cuadruple coloración, dando la apariencia de suberización. Aquí el daño celular permite establecer una delimitación clara con respecto al tejido sano de la parte interna del callo, se observa degradación del núcleo (fig.20A).

Los callos de "Gran Enano" sometidos a 300 $\mu$ l mostraron un daño más profundo puesto que todas las células de la periferia estaban completamente destruidas y las paredes tiñieron de color negro (Fig.20B).

Los tratamientos testigos utilizados testigo no causaron lesiones en los callos. Por el contrario, fueron callos que crecieron de manera normal y en algunos casos produjeron gran cantidad de embriones.

Todos estos resultados contrastan con lo observado en "Calcuta 4" donde, se observó muy poco daño. Los callos conteniendo las mayores concentraciones del extracto crudo de *M. fijiensis*, presentaron un ligero oscurecimiento del núcleo y del contenido citoplásmico de las células más externas del callo. Sin embargo no se observó deterioro de las paredes de estas células, las cuales mantuvieron un desarrollo normal con producción de embrión en algunos casos. (Figs.21)

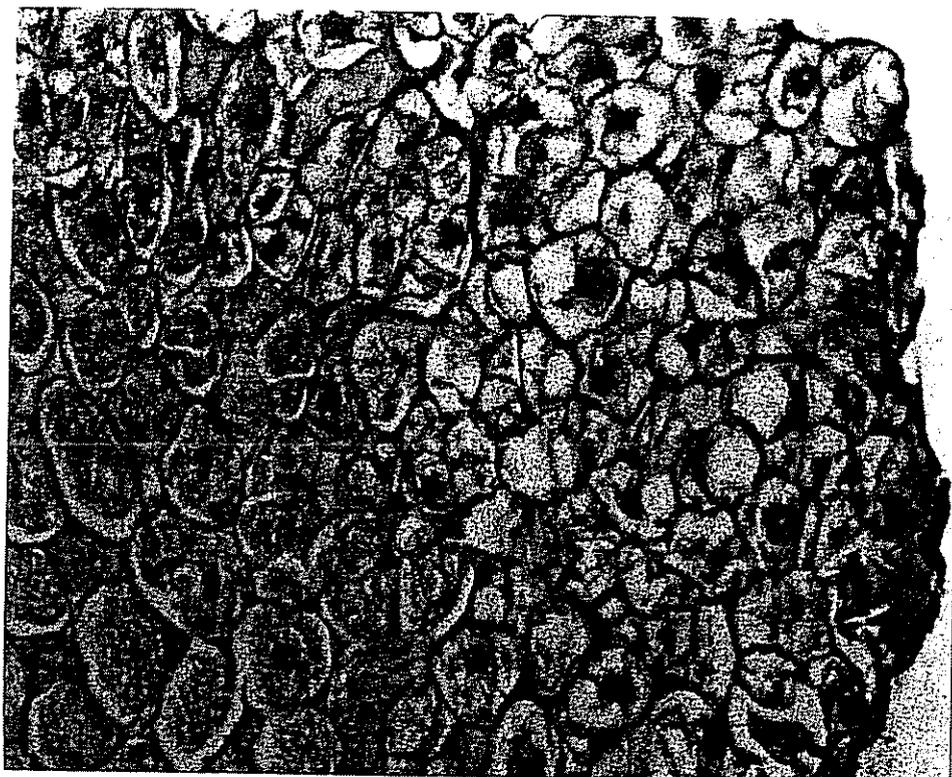


Figura 20. Sección transversal de callos de "Gran Enano" inoculados con 100 $\mu$ l(A) y 300 $\mu$ l(B) de extracto crudo de *M. fijiensis*.

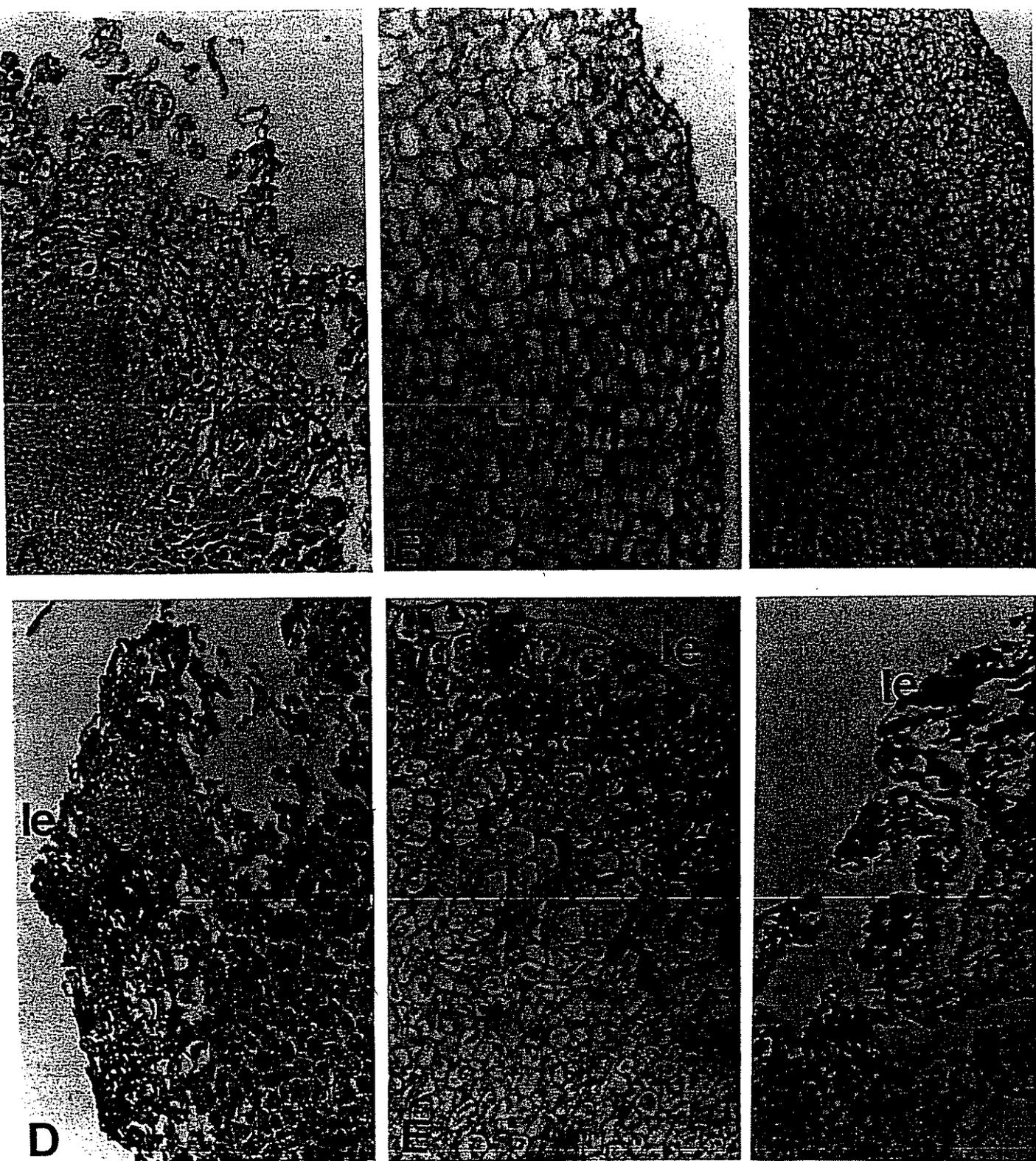


Figura 21. Sección transversal de callos de "Gran Enano" y "Calcuta 4". Respuestas al extracto crudo. (A), "Gran Enano", testigo 4x; (B), "Calcuta 4" 100µl del extracto 10x; (C), "Calcuta 4" 300µl 4x; (D), "Gran Enano" 60µl, 4x; (E), "Gran Enano" 100µl, 4x

## V. CONCLUSIONES.

1. Al inocular hojas de vitroplantas con conidios y micelio de *Mycosphaerella fijiensis*, se pudo diferenciar el grado de resistencia de los clones "Gran Enano" y "Calcuta 4"; susceptible y resistente, respectivamente.
2. Se logró extraer un extracto crudo de *M. fijiensis*, y comprobar su efectividad en la selección de materiales resistentes a la enfermedad de la Sigatoka negra.
3. La inoculación de hojas con 40 µg del extracto crudo de *M. fijiensis* en carbonato de sodio al 0.5% y fosfato monobásico 0.1 M provocó el desarrollo de lesión en todos los cultivares estudiados. A las 96 horas después de inocular las hojas se pudo identificar los diferentes materiales de acuerdo a su grado de susceptibilidad a la enfermedad.
4. En la selección *in vitro* de cultivos embriogénicos de los materiales "Gran Enano" y "Calcuta 4", el uso del extracto crudo de *Mycosphaerella fijiensis* mezclado al medio de cultivo en dosis comprendidas entre 160 y 200 µg, permitió verificar sus grados de resistencia, o sea altamente susceptible y altamente resistente.
5. El análisis histológico de los diferentes materiales inoculados, en invernadero, permitió evidenciar la producción de compuestos fenólicos en las células oclusivas en el caso del clon "Calcuta 4" y en células epidérmicas vecinas en "Gran

Enano". Esto podría relacionarse con el grado de resistencia de estos materiales o sea hipersensible y susceptible. También se evidenció la presencia de compuestos fenólicos en los cortes realizados en hojas inoculadas con el extracto crudo. Así a las 96 horas después de la inoculación los cultivares susceptibles presentaban cantidades más altas de fenoles que los materiales resistentes. En esto es importante destacar que dentro de los clones resistentes, "Calcuta 4" y "Yangambí" conocidos por su hipersensibilidad presentaron cantidades de fenoles más altas que los materiales "Saba" y "EMBRAPA-403" ("Bras-403") cuya resistencia es de tipo horizontal.

Los análisis histológicos de los cultivos embriogénicos *in vitro*, del cultivar "Gran Enano" también permitieron evidenciar la presencia de fenoles y la oxidación de los tejidos superficiales del cultivo. A medida que aumentaba la dosis del extracto, la zona del tejido dañado se volvió más profundo. Al contrario, en el caso del clon resistente "Calcuta 4", no se evidenció por lo general ningún tipo de acumulación fenólica. Tampoco se observó la presencia de un tejido superficial dañado.

6. El uso del extracto crudo de *Mycosphaerella fijiensis* permite de manera rápida y eficaz -48 horas en invernadero y 72 horas *in vitro*- identificar el grado de resistencia de los materiales de *Musa*. Esto representa un significativo ahorro en tiempo y recursos en comparación de lo que representa una hectárea de selección al campo.

## VI. RECOMENDACIONES.

1. Efectuar pruebas de inoculación con conidios en invernadero utilizando los materiales "Curraré", "Yangambí", "Saba", y "Embrapa-403".
2. Realizar pruebas de inoculación del extracto crudo sobre hojas unidas a la planta y colocadas en invernadero.
3. Caracterizar por medio de cromatografía, los compuestos fitotóxicos producidos en el medio M-1-D inoculado.
4. Establecer suspensiones celulares con los callos sometidos a presión de selección y tratar de obtener plantas enteras.
5. Determinar por medio de cromatografía el tipo de compuesto fenólico que se produce en las plantas evaluadas, como respuesta al extracto crudo de *M. fijiensis*.
6. Probar diferentes dosis del extracto crudo en inoculación sobre hojas, para determinar la dosis mínima que permita diferenciar la resistencia de los materiales evaluados.
7. Probar en callos de los materiales "Curraré", "Yangambí", "Saba" y "Embrapa-403" las concentraciones de 60, 80 y 90  $\mu$ l del extracto crudo y observar su reacción.

## LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. N. 1986. Fitopatología Ed. Limusa. Mexico 756p.
- ALEXOPOULUS, C. J. 1962. Introductory Mycology. 2 Ed. Wiley, New York 613p.
- ARGENT, G. C. 1976. The wild bananas of Papua New Guinea. Notes from the Royal Botanic Garden, 35: 77-114.
- ASSANTE, G. et al. 1977. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. Phytochemistry 16:242-247.
- BAILEY, J. A. et MANSFIELD, J.W. 1982. Phytoalexins. Blackie, Glasgow, London.
- BALIS, C. and PAYNE, M. G. 1971. Triglycerides and cercosporin from *Cercospora beticola*: fungal growth and cercosporin production. Phytopathology 61: 1477-1484.
- .; HORRY, J. P.; TEISSON, C.; TEZENAS DU MONTCEL, H. et GANRY, J. 1990. L'amélioration génétique des bananiers à l'IRFA/CIRAD Fruits édition special.
- BAUER de, M. de L. 1984. Fitopatología. México Ed. Futura pp 239-272.
- BEHNKE, M. 1979. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. Th. app. genet. 55:69-71.
- BEVERAGGI, A. 1988. Contribution à l'étude physiopathologique de la résistance des bananiers et plantains au *Mycosphaerella fijiensis*. Thèse D.E.A. Academie de Montpellier, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 26p.
- . 1993. Etude des interactions hôte-parasite chez des bananiers sensibles et résistants inoculés par *Cercospora fijiensis* responsable de la maladie des raies noires. Thèse Ph. D. Montpellier, Francia, Université Montpellier II Science et Techniques du Languedoc. pp 1-47.
- BIOLEY, J. P.; JAY, M. et FIASSON, J. L. 1987. Mécanisme biochimiques du métabolisme secondaire dans la réaction des végétaux cultivés aux pathogènes fongiques. Informations Techniques CETIOM, 101, 7-19.

- BRETTELL, R., INGRAM, D. S. and THOMAS, E. 1979. Selection of Tms-cytoplasm maize tissue cultures resistant to *Drechslera maydis* T-toxin. *Maydica* 24, 203-213.
- BUIATTI, M. y INGRAM, D. S. 1991. Phytotoxins as tool in breeding and Selection of disease-resistant plants. *Experientia* 47:810-819.
- BUITRAGO R, A. Y PACHECO de P, M. 1991. Efecto del filtrado de *Colletotrichum* sp. en la expresión de síntomas de mancha mantecosa en cafetos cultivados *in vitro*. *Cenicafé Colombia* 42(1):5-12,
- CALDWELL, R. M. 1968. Breeding for general and/or specific plant disease resistance Proc. 3rd int. Wheat. Gen. Symp. pp 714-715.
- CAMARDA, L.; MERLINI, L. and NASINI, G. 1976. Metabolites of *Cercospora*. Taiwapyrone, anpyrone of unusual structure from *Cercospora taiwanensis*. *Phytochemistry* 15: 537-539.
- CARLSON, P. S. 1973. Methionine sulphoximine-resistant mutants of tobacco. *Science* 180:1366-1368.
- CARRASCO, A.;BOUDET, A. M. and MARIGO, C. 1978. Enhanced resistance of tomato plants to *Fusarium* by controlled stimulation of their natural phenolic production. *Physiol. plant pathol.* 12: 225-232.
- CIRAD 1989. Manual pratique d'histologie végétale. Montpellier. 61p.
- CHAWLA, S. Y WENZEL, J. 1987. In vitro selection of barley and wheat for resistance against *Herminthosporium sativum*. *TAG* 74:841-845.
- CORNIDE, M.T.; LIMA, H.; GALVEZ G. Y SIGARROA, A. 1985. Genética vegetal y fitomejoramiento. Ed. por Carlos de la Torre. Ministerio de cultura, La Habana, Cuba pp 379-446.
- .; 1985. Resistencia genética In: Genética vegetal y fitomejoramiento. Ed. por Carlos de la Torre. Ministerio de cultura, La Habana, Cuba.
- CRUICKSHANK, I. A. M. and PERRIN, D. R. 1964. Pathological function and phenolic compounds in plants. In: *Biochemistry of phenolic compounds* J. B. Harborne, ed. pp 511-544. Academic Press, New York.

- EBEL, J. 1986. Phytoalexin syntesis:the biochemical analysis of the induction process. Annual Review of Phytopathology 24,235-264.
- EDNEY, K. L. 1958. Observations on the infection of Cox's Orange pippin aples by *Gloeosporium peregrans*. Ann. Appl. Biol. 46, 622-629.
- ESCALANT, J. V. y TEISSON, C. 1989. Somatic embryogenesis and plants from inmature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant cell reports (Alemania) 7:665-668.
- .; 1989. Using tissue culture techniques for production of new varieties of plantain and early screening against black Sigatoka. In: Sigatoka leaf spot diseases of bananas proceedings of an international Network for the Improvement of banana and plantain (INIBAP), San José, Costa Rica. pp 338-347.
- .; TAPIA, A.C. y SANDOBAL, J. 1991. Inducción de callos, suspensión de células y posibilidad de regeneración en *Musa* sp. previa presión de selección. In: Acorba 89, memorias IX reunión Bruno Añez et al.(editores) Maracaibo, Venezuela. pp 35-43.
- .; 1993. Embriogenesis somática y suspensiones celulares. Apuntes de clases Cultivo de tejidos. Turrialba, CATIE. 21P.
- .;TEISSON, C. 1993. Plant regeneration through somatic embryogenesis from male flowers of banana and plantain triploid cultivars (*Musa* sp.) CATIE 10p.
- .; TEISSON, C.; GRAPIN, A. 1994. Embriogénesis somática Amplificada a partir de flores masculinas de los cultivares triploides de banano y plátano. Unidad de biotecnología CIRAD-FLHOR/CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- EVANS, P. R.;SHARP, W. R.;AMMIRATO, R. V. YOMITA, Y. 1983. Future prospects of *in vitro* selection of Coffee rust resistant plants In: Handbook of Plant Cell Culture. M. Alpes de Lima and P. O. Larsen (eds) vol 1 35:872-947.
- DAUB, M. E. 1982. Cercosporin, a Photosensitizing toxin from *Cercospora* species. Phytopathology 72, 370-373.

- . 1986. Tissue culture and selection of resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathol.* 24:159-186.
- FAJOLA, A. O. 1973. Cercosporin, a new phytotoxin from *Cercospora* species. Abstracts of papers, 2nd International Plant Pathology Congress. University of Minnesota, Sept. 5-12. Abst. 0670.
- FARKAS, G. L. and KIRALY, Z. 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. *Phytopathology Z.* 44:8-150.
- FAO, 1992. Anuario de producción 1991. *Statistis Series* número 104. Roma, Italia.
- FLORES, E. M. 1989 *La planta: estructura y función.* Editorial Tecnológica de Costa Rica, Instituto tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- 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.* Vol 40(6):393-399.
- . y LESCOT, T. 1988. Variabilité génétique de *Mycosphaerella* infeodés au genre *Musa*. Mise en évidence de la présence au Camerun sus bananiers et plantains d'une Cercosporiose (*Mycosphaerella musicola*) au comportement pathogène atypique. *Fruits (Francia)* 43(7-8):407-415.
- .; MOULIOM P., A. MOURICHON, X. 1990. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* MORELET, au Cameroun. Caractérisation de la resistencia au champ de bananiers appartenant a deviers groups génétiques. *Fruits Francia* 45(4):339-345.
- . 1993. Programa internacional de evaluación de *Musa*; Resultados de la reunión del grupo de expertos en *Mycosphaerella fijiensis* In: informe de la primera reunión regional del programa internacional de evaluación de *Musa*. Ramiro Jaramillo et al. editores. La Lima, Honduras 83p.
- FRENCH, E. R. Y HEBERT, T. T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica.

- FRIC, F. 1976. Oxidative enzymes. In: Physiological Plant pathology, Heitefuss R. et Williams P. H. ed., Springer-Verlag, Berlin, pp 617-631.
- FROSSARD, P. 1980. Apparition d' une nouvelle et grave maladie foliaire des bananiers et plantains au Gabon: la Maladie des raies noires: *Mycosphaerella fijiensis* MORELET. Fruit (Francia) 35 (9): 519-527.
- GENGENBACH, B. G. et al. 1977. Inheritance of selected pathotoxin-resistance in maize plants regenerated from cell cultures. USA 74:5113-5117.
- GONZALEZ, M. 1987. Enfermedades del cultivo del banano. Universidad de Costa Rica, San José 98p.
- GOODMAN N. R.; KIRALY, Z. et WOOD, K. R. 1986. The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press, Columbia pp 1-3.
- HEINZ, D. J., KRISHNAMURTHI, M., NICKELL, L. G. y MARETZKI, A. 1977. Cell tissue and organ culture in sugarcane improvement. In: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S., ed Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1-17.
- HIORTH, G. E. 1985. Genética cualitativa I: Fundamentos Biológicos. Córdoba, Republica Argentina, Pugliese-Siena S.R.L. pp 313-332.
- INFOMUSA 1991. Avances en el programa de mejoramiento genético del banano y el plátano en el INIVIT en Cuba: un avance de investigación. INIBAP Agropolis Montpellier, Francia vol. 1 #1 pp 3-5.
- INGHAM, J. L. 1973. Disease resistance in higher plants: The concept of pre-infectious and post-infectious resistance. Phytopath. Z. 78:314-335.
- JONES, D. R. 1990. Sigatoka negra en la región del Pacífico del Sudeste Asiático. Musarama INIBAP Agropolis Montpellier, Francia vol. 3 #1 pp 2-5.
- KEEN, N. T. 1975. Specific elicitors of phytoalexin production: Determinants of race specificity in pathogens? Science 187:74-75.
- KIRALY, Z.; BARNA, B. and ERSEK, T. 1972. 'Hipersensibilidad as a consequence, not the causa of plant resistance to infection' Nature, 239:456-458.

- .; 1980. Hypersensitivity. In: plant disease An Advanced Treatise. Academic Press, New York. Vol 5:201-224.
- KNIGHT, R. L. 1952. The genetics of jassid resistance in cotton. The genes H1 and H2 journal genetics 51: 47-66.
- KOHMOTO, K. and OTANI, H. 1991. Host recognition by toxigenic plant pathogens. *Experientia* 47: 755-764.
- KUC, J. 1964. Phenolic compounds and disease resistance in plants. In: Phenolic in normal and disease fruits and vegetables. Proc. plant phenolics V. C. Runeckles, ed. pp 63-81.
- KOSUGE, T. 1969. The role of phenolics in host response to infection. *Annual Rev. Phytopathology* 7:195-222.
- KRIKORIAN, A. D. y CRONAUER, S. 1984. In: Evans, D. A. et al. (eds). Handbook of Plant Cell Culture. Mc millan Publishing, Nueva York. 2,327-348.
- LAVILLE, E. 1983. Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Généralités. *Fruits*, 38(3):147-151.
- LEACH, R. 1964. Report on investigations into the cause and control of the new banana disease in Fiji. Leg. Coun. Fiji, IICA pp 38.
- LEATHAM, G. F.; KING, V. and STAHMANN, M. A. 1980. *In vitro* protein polymerization by quinones or free radicals generated by plant or fungal oxidative enzymes. *Phytopathology* 70:1134-1140.
- LEON, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. San José. Costa Rica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas 445p.
- LEPOIVRE, M. 1990. Etude sur les médiateurs chimiques toxiques In: Elaboration de stratégies de lutte efficace contre la Cercosporiose noire. Rapport periodique n°1 pp10-13.
- LEVIN, D. A. 1976. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annual Review Ecology System*. Vol 7 pp212-159.

- MACE, M. E. 1964. Peroxidases and their relation to vascular browning in banana root. *Phytopathology*, 54, 1033-1034.
- MCGAHAN, M. W. 1961. Studies of the seed of banana. I. Anatomy of the seed and embryo of *Musa balbisiana*. *American Journal of Botany* (EE.UU.) 48:230-238.
- MANNERS, J. G. 1986. Introducción a la fitopatología. Mexico, Limusa. 295p.
- MARIN, V. D. Y ROMERO, R. 1992. El combate de la Sigatoka negra. CORBANA, Costa Rica. Boletín #4 pp 4-5.
- . 1993. Programa internacional de evaluación de *Musa*; Resultados de la reunión del grupo de expertos en *Mycosphaerella fijiensis* In: informe de la primera reunión regional del programa internacional de evaluación de *Musa*. Ramiro Jaramillo *et al.* editores. La Lima, Honduras 83p.
- MARROQUIN, C. 1991. Suspensiones celulares y embriogénesis somática en *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba Costa Rica CATIE 102p.
- MATEILLE, T. 1992. Contribution á l'étude des relations hôte-parasite entre le bananier *Musa acuminata* (groupe AAA) et trois nématodes phytophages: *Radopholus similis*, *Helicotylenchus multicinctus* et *Hoplolaimus pararobustus* (Tylenchida). In: BEVERAGGI, A. 1993. Etude des interactions hôte-parasite chez des bananiers sensibles et résistants inoculés par *Cercospora fijiensis* responsable de la maladie des raies noires. Thesis Ph. D. Montpellier, Francia, Université Montpellier II Science et Techniques du Languedoc. pp 6-47.
- MELANDER, L. W. Y CRAIGIE, J. H. 1927. Nature of resistance of *Berberis* spp. to *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 17, 95-114.
- MEREDITH, D. S. Y LAWRENCE, J. S. 1969. Black leaf streak disease of banana (*Mycosphaerella fijiensis*), symptoms of disease en Hawaii and notes of the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society*. 52(3): 459- 476.

- .; 1970. Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella fijiensis* and *musicola* IN: Jones, D. R. Sigatoka negra en la región del Pacífico del Sudeste Asiático. Musarama INIBAF Agrópolis, Montpellier, Francia pp 2-5.
- .; *et al.* 1973. Ascospore release and dispersal in black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*) Transactions British Mycological Society 60(3):547-554.
- METLITSKII, L. V. and OZERETSKOVSKAYA, O. L. 1968. Plant immunity: Biochemical Aspects of Plant Resistance to Parasitic Fungi. Plenum Press, New York pp 3-6.
- MOESTA, P. and CRISEBACH, H. 1980. Effects of biotic and abiotic elicitors on phytoalexin metabolism in soybean. Nature. Vol. 286, 710-711.
- MOLINA, G. Y KRAUZ, J. 1989. Actividad fitotóxica en extracto de cultivo de *M. fijiensis* var. *difformis* y su uso para evaluar patrones de resistencia a Sigatoka negra plant disease (USA). 73 (2): 142-144.
- MOREL, G. 1950. Sur la culture des tissus de deux monocotylénes C. R. Acad. Sc. Paris 230: 1099-1101.
- MOURICHON, X. 1986. Mise en évidence de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet agent de la maladie des raies noires (Black leaf streak) des bananiers et plantains au Congo. Fruits 41 (6): 371-374.
- .; PETER, D.; ZAPATER, M. F. 1987. Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur jeunes plantules de bananier issues de culture *in vitro*. Fruit (France) 45(4):195-198.
- .; Y ZAPATER, M. F. 1990. Obtention *in vitro* du stade *Mycosphaerella fijiensis*, forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. Fruits (France) 45 (6): 553-557.
- MUELLER, W. C. et BECKMAN, C. H. 1973. Ultrastructure of phenol-storing cells in the roots of banana. Physiology plant pathology, 4: 187-190.
- .; et BECKMAN, C. H. 1976. Ultrastructure and development of phenolic-storing cells in cotton roots. Can. J. Bot., 54: 2074-2082.

- MÜLLER, K. O. y BORGER, H. 1941 Experimentelle untersuchungen uber die Phytophthora-resistenz de Kartoffel. Arb. biol. Reich anst. Land-u. Forstw. Berlin 23, 189-231. In: MANNERS, J. G. 1986. Introducción a la fitopatología. México, Limusa. 295p.
- .; 1950. Affinity and reactivity of Angiosperms to *Phytophthora infestans*. Nature 166: 392-395.
- .; 1956. Einige einfache versuche zum nachwers von phytoalexinen. Phytopathology 27: 237-254.
- MULDER, J. L. Y STOVER, R.H. 1976. *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. Transactions of the Bristish Mycological Society. 67(1): 77-82.
- MUMMA, R. O.; LUKEZIC, F. L. and KELLY, M.G. 1973. Cercosporin from *Cercospora hayii*. Phytochemistry 12,917-922.
- MURASHIGE, T. Y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assys with tobacco tissue cultures. Plant Physiology (EE UU) 15:473-497.
- NGEZAHAYO, F. 1993. Programa internacional de evaluación de *Musa*; Resultados de la reunión del grupo de expertos en *Mycosphaerella fijiensis* In: informe de la primera reunión regional del programa internacional de evaluación de *Musa*. Ramiro Jaramillo *et al.* editores. La Lima, Honduras 83p.
- OCHSE, J. *et al.* 1985. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales Editorial Limusa México vol.1 pp 437-462.
- OSBORNE, R. E. 1962. Bodles altart, a new banana for Jamiaca. Jamaica Occ. Byll. 3:7.
- PASBERG G., C. 1993. Programa internacional de evaluación de *Musa*; Resultados de la reunión del grupo de expertos en *Mycosphaerella fijiensis* In: informe de la primera reunión regional del programa internacional de evaluación de *Musa*. Ramiro Jaramillo *et al.* editores. La Lima, Honduras 83p.
- PATIL, S. S. and DIMOND, A. E. 1967. Inhibition of *Verticillium polygalacturonase* by oxidation products of polyphenols. Phytopathology 57:492-496.

- PAXTON, J. D. 1981. Phytoalexins. A working redefinition. *Phytopathol. Z.* 101:106-109.
- PEARSON, M. N.; BULL, P. B. et SHEPHERD, K. 1983. Possible sources of resistance to black Sigatoka in the Papua New Guinea Biological Foundation Banana Collection. *Tropical Pest Management*, 29(4):303-308.
- PONS, N. 1987. Notes on *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Transaction of the British Mycological Society* 89 (1): 120-124.
- QUINON, V. L. 1972. Epidemiology and control of black leaf disease of bananas caused by *Mycosphaerella fijiensis*. Thesis Ph.D. Hawaii, Universidad de Hawaii. 139p.
- RAMOS, M. Y MARIBONA, R. H. 1988. Purificación y caracterización inicial de la toxina de *Drechslera (Helminthosporium) sacchari*. *Rev. Protección Veg.* 3:98-105.
- REDDY, D. B. 1969. Quarterly Newsletter of The plant Protection committee for South East and Pacific region. *FAO Bangkok, Tailand* (12): 1-3.
- REEVE, R. M. 1951. Histochemical test for polyphenoles in plant tissues. *Stain Technology* 26, 91-96.
- RHODES, P. L. 1964. A new banana disease in Fiji. *Commonwealth Phytopathological News* 10:38-41.
- ROBERT, M L. Y LOYOLA, V. M. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. Centro de investigación científica de Yucatan, A.C. México 167p.
- ROBERTS, M. F. Y MARTIN, J. T. 1963. Withertip disease of limas (*Citrus aurantifolia*) in Zanzibar the leaf cuticle in relation to infection by *Gloeosporium limetticola* Clausen *Ann Aplic.Biolog.* 51:411-413.
- ROHRINGER, R. and SAMBORSKI, D. J. 1967. Aromatic compounds in the host-parasite interaction. *Annual Rev. Phytopathology* 5:77-86.
- ROSALES, F. 1993. Programa internacional de evaluación de *Musa*; Resultados de la reunión del grupo de expertos en *Mycosphaerella fijiensis* Ininformde la primera reunión regional del programa internacional de evaluación de *Musa*. Ramiro Jaramillo et al. editores. La Lima, Honduras 83p.

- ROWE, P. y RICHARDSON, D. L. 1975. Breeding bananas for disease resistance, fruit quality and yield. La Lima, Honduras. Tropical Agriculture Service 41p.
- . 1985. Fitomejoramiento de banano y plátanos. Unión de países Exportadores de Banano (UPEB) Panamá 19p.
- . 1993. El programa de mejoramiento de banano y plátano de la FHIA: perspectivas de desarrollo y cooperación In: INIBAP Red Regional para América latina y el Caribe; Informe de la primera reunión regional del programa internacional de evaluación de *Musa*. Ed. Ramiro Jaramillo La Lima, Honduras. pp 14-22.
- RUBIN, B. A. and ARTSIKHOVASKAYA, E. V. 1964. Biochemistry of pathological darkening of plant tissues. Annual Rev. Phytopathology. 2:157-178.
- SACRISTAN, M. D. 1982. Resistance responses of *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryonic cultures of haploid *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics 61, 193-200.
- SASAKI, T.; ICHIHARA, A. and SAKAMURA, S. 1981. Isolation of fulvic acid from *Cercospora beticola*. Phytopathologische Zeitschrift. 44,295-312.
- SCHEFFER, R. P. y PRINGLE R. B. 1963. Respiratory effects of the selective toxin of *Helminthosporium victoriae*. Toxicity of victoxinine. Phytopathology, 53:465-468.
- SCHLOSSER, E. 1980. Preformed internal chemical defenses In: Plant disease an advanced Treatise. Volume V: how plants defend themselves. Horsfall J. G. and Cowling E. B. (ed.) Academic Press, New York, 161-175.
- SHEPHARD, J. F., BIDNEY, D. and SHAHIN, E. 1980. Potato protoplastin crop improvement. Science 208(4439),17-24.
- . *et al.* 1986. Mejoramiento genético del banano y plátano en Brasil y Honduras. UPEB Panamá 55p.
- . ; DANTAS L, J.L. Y ALVES, J. E. 1986. Mejoramiento genético del banano In: Mejoramiento genético de banano y plátano en Brasil y Honduras Ed. Unión de Países Exportadores de Banano (UPEB), Panamá. pp 1-19.

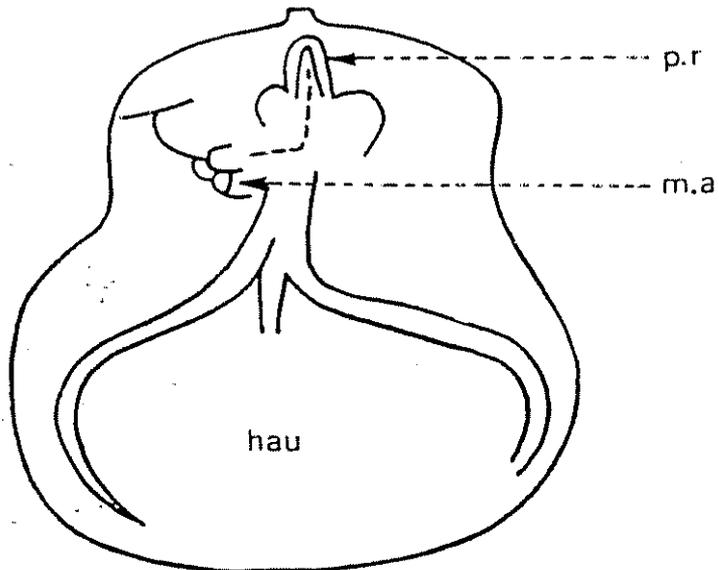
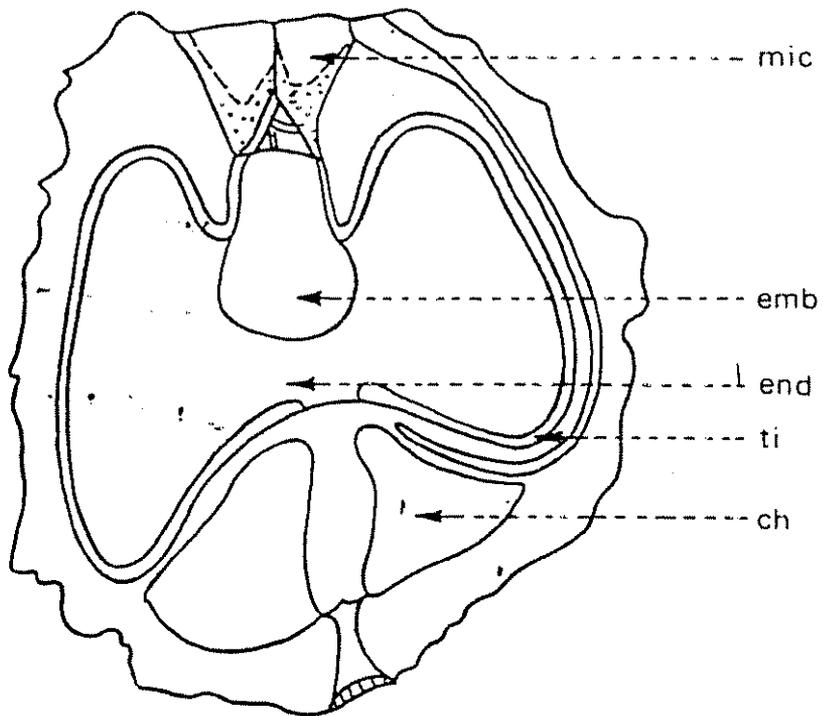
- SHIH, C. T.; MA, S. S.; HUANG, I. C. and CHING, W. H. 1992. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in suspension cell cultures of triploids banana (*Musa* AAA subgroup *Cavendish*). In: Abstract of International Symposium on Recent Development en Banana Cultivation Technology; Fifth Meeting of International Group on Horticultural Physiology of Banana, Pingtung, Taiwan pp 21-22.
- SIMMONDS, N. W. and SHEPHERD, K. 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London. Botany (England)* 55 (359):303-012.
- . 1962. *The evolution of the bananas*. New York J. Wiley 170p.
- SOTO, B. M. 1985. *Bananos: cultivo y comercialización*. San José, Costa Rica 627p.
- STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H. 1988. *Bioestadística: Principios y procedimientos* R. Martínez B. 2<sup>da</sup> edición Mexico D.F. McGraw-Hill. 622p.
- STIERLE, A. A. *et al.* 1991. The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia* 47:853-859.
- STOVER, R. H. 1972. *Banana, Plantain and Abaca diseases* Kew, England.
- .; Y DICKSON, J. D. 1976. Bananas leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis*; a comparison of first Central American epidemics. *Plant Protection Bulletin*. FAO 24: 36-42.
- . 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantains plant disease. 64(8): 750-755.
- . 1983. Effet du *Cercospora* noir sur les Plantains en Amerique Centrale. *Fruits* 38: 326-329.
- . 1986. Disease management strategies and the survival of the banana industry. *Ann. Rev. Phytopathology* 24,83-91.

- TAPIA, A. C. 1993. Distribución altitudinal de la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*) y la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica.
- UPADHAYAY, R.; STROBEL, G. A. Y COVAL, S. 1990. Some toxins of *Mycosphaerella fijiensis* In: Sigatoka leaf spot diseases of bananas proceedings of an international Network for the Improvement of banana and plantain (INIBAP), San José, Costa Rica. pp 225-236.
- UPEB 1990. Epidemiología y Ecología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) en plátano (*Musa* sp.) en Costa Rica. Panamá 126.
- . 1992. Aislamiento de fitoalaxinas en banano atacado por Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Informe 93 Panamá pp 31-45.
- WALKER, J. C. y STAHMANN, W. A. 1955. Chemical nature of disease resistance. Annual Rev. Physiology 6, 351-366.
- WEEB, J. L. 1966. Quinones, enzymes and metabolic inhibitors. Vol. 3. Academic Press New York.
- WHEELER, H. and LUKE, H. H. 1963. Microbial toxins in plant disease. Annual Rev. Microbiology. 17:223-242.
- WILLIAMS, C. A. et HARBORNE, J. B. 1977. The leaf flavonoids in the Zingiberales. Biochemistry Sist. Ecol., 5:221-224.
- WISEUR, J. 1984. Selection *in vitro* de calcs de betterave tolérants á la cercosporine, une toxine fongique extraite de *Cercospora beticola* Sacc. Annales de Gembloux 90: 39-44.
- YOUNG, M. et al. 1978. Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Volumen 1 National Academy of Sciences Ed. Limusa S.A. México D. F. 223p.

## Anexo 1 A. MEDIO M-1-D MODIFICADO

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub> O	0,283 g/l
KNO <sub>3</sub>	79,000 mg
KCl	65,000 mg
MgSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O	0,736 g
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	0,908 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> + C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	4,990 g
FeCl <sub>3</sub> + 6H <sub>2</sub> O	3,000 mg
MnSO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	5,000 mg
ZnSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O	2,500 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,360 mg
KI	0,750 mg
Sacarosa	30,000 g
pH 5,5 (HCl 1N)	

Medio de cultivo utilizado para la producción de toxina del hongo *M. fijiensis* (Upadhyay y Strobel, 1989).



ANEXO 2 A. Representación esquemática de una semilla y de un embrión de Musa (Mcgahan 1961). Mic=micropilo; ch=chalaza; emb=embrión; end=endopermo; ti=tegumento interno; pr=polo radical;

ANEXO 3 A. Medios empleados para la evaluación *in vitro* de la resistencia al extracto crudo en callos de *Musa*

Medio pi 0.5

(en callos de "Calcuta 4")

Macro MS

Micro MS

Fe EDTA

Vitaminas de Morel

Sacarosa 30g/l

pH 5.8

Picloram 0.5/l

Gelrite 2 g/l

Medio MA2

(en callos de "Gran Enano")

Macro MS

Micro MS

Fe EDTA

Vitaminas MS

Biotina 1 mg/l

Glutamina 100 mg/l

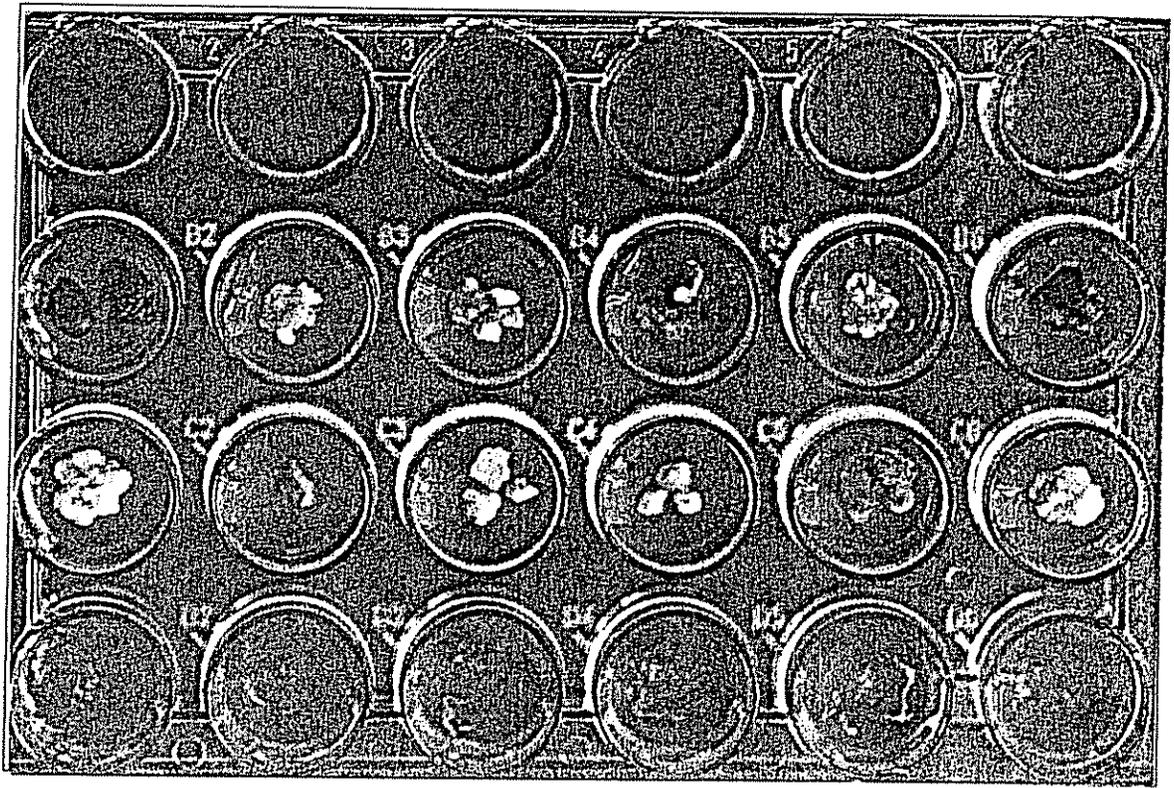
Extracto de malta 100 mg/l

2,4-D 1 mg

Sacarosa 45 g/l

pH 5.3

Gelrite 2 g/l



ANEXO 4. Cámara de 24 pozos en los cuales se colocaron los diferentes tratamientos conteniendo los callos de los materiales "Calcuta 4" y "Gran Enano".

## Anexo 5 A. PREPARACION DE CORTES HISTOLOGICOS.

## 1. Cortes en parafina.

## 1.1 Fijación.

Las muestras fueron fijadas y conservadas en una solución de F.A.A. (10 ml de formalina, 50 ml de alcohol de 95°, 30 ml de agua destilada y 10 ml de ácido acético) durante 48 horas.

## 1.2. Deshidratación.

* Etanol 50%	1 hora
* Etanol 70%	1 hora o toda la noche
* Etanol 80%	1 hora
* Etanol 90%	" "
* Etanol 95%	" "
* Etanol 100%	" "
* Etanol 100%	" "
* Etanol 100% + Tolueno	30 minutos
* Tolueno puro	1 hora
* tolueno puro	" "

## 1.3. Impregnación

* Tolueno + parafina	30 minutos
* Parafina 55-60°C	2 horas
* Parafina 55-60°C	2 horas
* Parafina 55-60°C	" "

#### 1.4. Inclusión en bloques de parafina.

#### 1.5. Realización de cortes en micrótomo manual de rotación.

- \* Se hacen cortes de 8 um de grosor
- \* Se colocan en portaobjetos cubiertos con adhesivo Haupt y formalina sobre una platina caliente a 45-50°C.

#### 1.6. Desparafinación.

- |                         |            |
|-------------------------|------------|
| * Xileno puro           | 10 minutos |
| * Xileno puro           | " "        |
| * Xileno + alcohol 100% | 5 minutos  |
| * Etanol 100%           | 3 minutos  |
| * Etanol 95%            | " "        |
| * Etanol 70%            | " "        |

#### 1.7. Coloración cuádruple.

- |   |             |
|---|-------------|
| * Safranina al 2%                           | 30 minutos  |
| * Agua destilada                            | 5 segundos  |
| * Cristal violeta 2%                        | 90 segundos |
| * Etanol 100%                               | 3 minutos   |
| * Etanol 100%                               | " "         |
| * Aceite de clavo, orange G<br>y Fast Green | 2 minutos   |
| * Aceite de clavo + orange G                | 2 minutos   |
| * Aceite de clavo + orange G                | " "         |
| * Aceite de clavo + orange G                | " "         |
| * Xileno-Etanol                             | 5 minutos   |
| * Xileno                                    | 5 minutos   |
| * Xileno                                    | " "         |
- \* se coloca al cubreobjetos dos gotas de Permunt y se deja secar a temperatura ambiente.

## 2. Cortes en resina.

### 2.1. Fijación.

Las muestras fueron fijadas en F.A.A. por 48 horas.

### 2.2. deshidratación.

* Etanol 50%	1 hora
* Etanol 70%	''
* Etanol 80%	''
* Etanol 90%	''
* Etanol 100%	''
* Etanol 100%	''

### 2.3. Impregnación.

\* 100 ml de resina + 1 g de activador.

### 2.4. Inclusión.

- \* 15 ml de solución de impregnación + 1 ml de endurecedor
- \* Polimerización a temperatura ambiente.

### 2.5. Cortes en ultramicrotomo para resina.

- \* Se hacen cortes de 3.5 micras de grosor
- \* Colocar los cortes en cubreobjetos con agua destilada.

## 2.6. Coloración.

- \* Colorear durante 1 minuto con azul de toluidina al 1%.
- \* Lavar el colorante con agua destilada
- \* Secar a temperatura ambiente.

## 3. Preparación de Colorantes usados en las tinciones.

### 3.1. Safranina al 2%.

- \* Diluir 2 g en 100 ml de etanol al 50%.

### 3.2. Violeta Cristal al 2%.

- \* Diluir 2 g de violeta cristal en 100 ml de agua destilada.

### 3.3. Fast Green al 1%.

- \* diluir 1g en etanol 100%.

### 3.4. Orange G.

- \* 9 partes de aceites de clavo saturadas de Orange G y 1 parte de Fast Green.

Anexo 6 A. Análisis de varianza para el periodo de incubación de vitroplantas inoculadas con conidios de *C. fijiensis*.

Fuente	Gl	Cme	Hcal	Pr > F
Clon	1		176.40	0.0001
Error	18	4.00		
R <sup>2</sup> = 0.9074		C' V. = 5.12		

Anexo 7 A. Promedio del tamaño de las lesiones (mm<sup>2</sup>) en dos hojas de seis materiales de *Musa sp.* inoculados con Agua (carbonato de sodio al 0.5% y fosfato monobásico 0.1M.)

Clon	Período de evaluación (horas)			
	24	48	72	96
Curraré	1.00	1.18	1.23	4.65
Gran Enano	1.00	1.10	1.18	6.10
Yangambi	1.00	1.13	1.10	1.45
Burmannicoides	1.00	1.23	1.20	2.68
Saba	1.00	1.15	1.05	1.08
Bras-403	1.00	1.48	1.68	2.86

Anexo 8 A. Promedio del tamaño de las lesiones (mm<sup>2</sup>) en dos hojas de seis materiales de *Musa sp.* inoculadas con el extracto testigo del medio M-1-D.

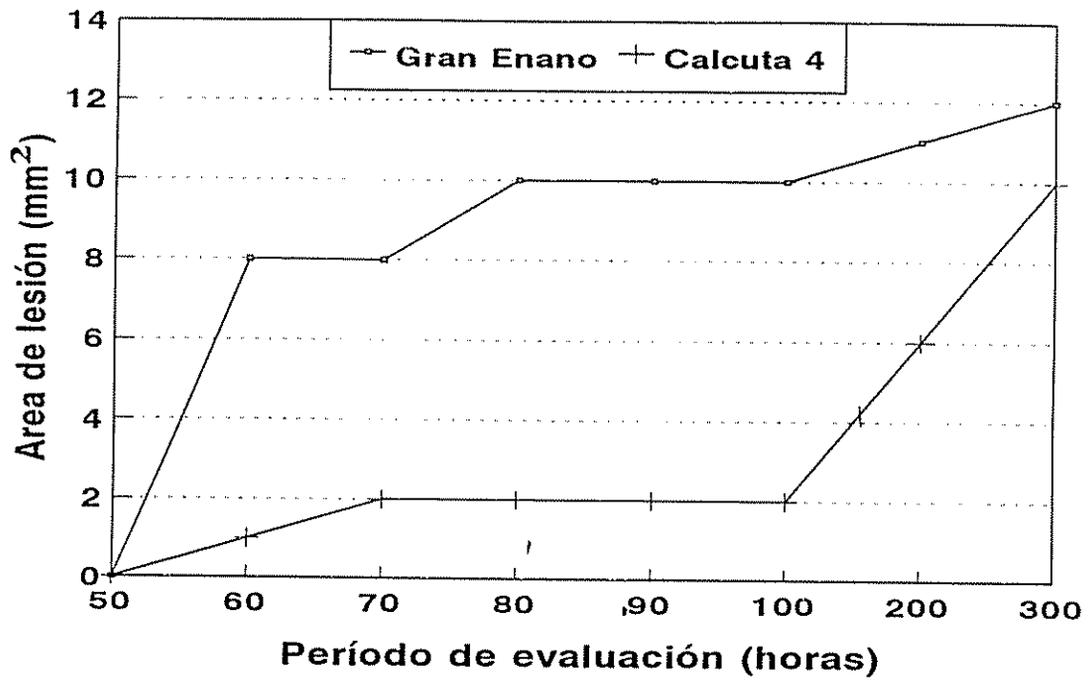
Clon	Período de evaluación (horas)			
	24	48	72	96
Curraré	1.00	1.05	1.70	7.70
Gran Enano	1.00	1.08	1.05	5.04
Yangambi	1.00	1.00	1.46	2.60
Burmannicoides	1.00	1.80	1.40	2.72
Saba	1.00	1.05	1.03	2.20
Bras-403	1.00	1.94	1.05	4.26

Anexo 9 A. Análisis de varianza de las lecturas del área de lesiones en dos hojas de seis clones de *Musa sp.* Segunda evaluación de inoculación.

Fuente	Gl	Cm	Fcal	Pr > F
Modelo	27	68.3424	26.49	0.0001
Error	20	2.5801		
Período de evaluación	3		25.52	0.0001
Clon	5		93.71	0.0001
P. de ev. X Clon	15		11.11	0.0001

R<sup>2</sup> = 0.9728

C. V. = 17.38



**Anexo 10. Respuesta de los callos de Gran Enano y Calcuta 4 a la inoculación de diferentes concentraciones del extracto crudo de *M. fijiensis*.**