

ENSAYO EN FRAGMENTOS DE HOJAS DE BANANOS Y PLÁTANOS (*MUSA* SPP.) PARA EL ESTUDIO A NIVEL MONOCÍCLICO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS SÍNTOMAS DE LA SIGATOKA NEGRA CAUSADA POR *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* MORELET

Luis Pérez Vicente,¹ Michel Pérez Miranda,¹ María Isabel Jiménez² y María Jama²

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

² Centro Biotecnológico del Ecuador (CIBE) de la Escuela Politécnica del Litoral en Guayaquil, Ecuador

RESUMEN

Se describe el desarrollo de un ensayo de inoculación artificial sobre fragmentos de hojas de clones de bananos y plátanos con diferentes niveles conocidos de resistencia parcial a sigatoka negra mantenidos in vitro. Se colectaron fragmentos de hojas de 3,5 x 3,5 cm de la primera hoja completamente expandida (10 frag/clon), los cuales se lavaron con agua estéril y colocaron en una placa de Petri de 10 cm con agar agua + benzimidazol (20 g agar.L⁻¹ + 40 µg.mL⁻¹ de benzimidazol). Se inocularon con diferentes concentraciones de conidios de *M. fijiensis* obtenidos de cultivos in vitro del patógeno e incubaron bajo luz fluorescente. La cantidad de lesiones y su evolución por estados durante un ciclo infeccioso se evaluó en días consecutivos. Se determinó la concentración óptima de inóculo para el desarrollo del ensayo. Existió una fuerte correspondencia entre las curvas de aparición de lesiones en relación con el tiempo en los fragmentos de hoja in vitro a nivel monocíclico y las curvas de desarrollo de la enfermedad en el campo a nivel policíclico en los clones respectivos, por lo que el método es aplicable para estimar el nivel de resistencia parcial de los clones frente a sigatoka negra y para comparar la agresividad de los aislamientos bajo condiciones controladas. La duración de la vida verde de las hojas en el ensayo no permitió determinar la intensidad de la reproducción sexual del patógeno.

Palabras clave: resistencia parcial, sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*, ensayo monocíclico

ABSTRACT

An assay of artificial inoculation on banana leaf fragments in vitro was studied. Fragments of 3.5 x 3.5 cm of the first fully expanded leaf (10 fragments/cultivar) were washed with sterilized water and placed in 10 cm Petri dishes containing 20 g agar.L⁻¹ + 40 µg.mL⁻¹ of benzimidazol. The fragments were inoculated with different concentrations of *M. fijiensis* conidia obtained from in vitro cultures the pathogen and were incubated under fluorescent light. The number of lesions and its evolution to different stages of development were assessed daily in a single infection cycle. The optimal conidial concentration for the development of the assay was determined. A strong correlation between the curves of development of lesions on time in the fragments in vitro at monocyclic level and the curves of development of the disease on time in different cultivars at polycyclic level in the field was observed allowing sustain that the method is useful to compare the level of partial resistance of *Musa* cultivars to Black Sigatoka disease and the aggressiveness of the populations under controlled conditions. The duration of the fragments green life in vitro in the experiments do not allowed assess the intensiveness of the sexual reproduction of the pathogen. Further research is required to increasing the green life of the fragments of banana leaves to allowing the formation of the sexual reproduction of the pathogen in the spots.

Key words: partial resistance, black sigatoka, *Mycosphaerella fijiensis*, monocyclic assay

INTRODUCCIÓN

La aparición de la sigatoka negra en Cuba causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, a finales de 1990 [Vidal, 1992], tuvo un impacto marcado en los costos de producción y especialmente en la estructura clonal de la superficie del país plantada de musáceas [Pérez *et al.*, 2002].

El uso de variedades resistentes es sin duda la estrategia más económica y ambientalmente sostenible de lucha contra esta enfermedad. Se han llevado a cabo nu-

merosos estudios sobre la resistencia de los clones de bananos y plátanos a *M. fijiensis* [Meredith y Lawrence, 1970; Firman, 1972; Fouré *et al.*, 1984; Fouré *et al.*, 1990; Fouré, 1994; Hernández y Pérez, 2001; Rowe, 1998].

Fouré (1994) describió dos tipos de reacciones en *Musa* frente a sigatoka negra: la reacción de incompatibilidad –resistencia muy alta o hipersensibilidad, observada en Yangambi Km 5 del subgrupo Ibota, AAA–, don-

de no ocurre reproducción del patógeno, y la reacción de compatibilidad con desarrollo de los síntomas y reproducción del patógeno, en la que se diferencian la resistencia parcial, que se expresa por un alargamiento del ciclo y disminución de la reproducción del patógeno con una baja tasa de incremento de la enfermedad, y la sensibilidad observada en los clones Cavendish y plátanos (AAB), caracterizada por un ciclo de la enfermedad corto, reproducción intensa, alta tasa de incremento de la enfermedad y grandes afectaciones del área fotosintética de la planta.

Hernández y Pérez (2001) determinaron la reacción y componentes de la resistencia a sigatoka negra de los clones FHIA 23, FHIA 2, FHIA 3, FHIA 18, SH 3436 y de un grupo importante de clones naturales del banco de germoplasma de Cuba, entre los que se encontraban diferentes clones pertenecientes al subgrupo Cavendish (AAA), plátanos (AAB), el Yangambi Km 5 (subgrupo Ibota, AAA), el Paka (AB) y el Burro CEMSA (ABB), mantenidos sin tratamiento con fungicidas durante todo el tiempo que duraron las observaciones. Los clones FHIA con resistencia parcial a sigatoka negra mostraron un alargamiento estadísticamente significativo de la duración en días entre la emergencia de las hojas y la aparición y duración de la evolución de las lesiones, en relación con el clon Gran enano susceptible. La resistencia parcial de estos clones se expresa mediante el alargamiento de la evolución o transición de los síntomas de rayas a necrosis y en la reducción del número de pseudotecios por mancha [Pérez, 1998]. En el Yangambi Km 5 las aloinfecciones a partir de inóculo producido en parcelas vecinas determinaron la aparición de numerosas manchas y defoliaciones, pero no la formación de espermogonios y pseudotecios.

En Cuba más de 11 000 ha de superficie de bananos y plátanos están cultivadas de híbridos FHIA [Pérez *et al.*, 2002]. Por cuanto la resistencia parcial es de carácter cuantitativo, el ambiente tiene una fuerte influencia en el resultado de la evaluación de la reacción de los clones, por lo que es altamente deseable disponer de un ensayo bajo condiciones controladas que permita determinar la reacción de los clones y los cambios de agresividad de las poblaciones del patógeno bajo condiciones ambientales estables y comparables.

El Hadrami *et al.* (1998, 2000) desarrollaron ensayos en fragmentos de hojas *in vitro* de diferentes cultivares de bananos y plátanos, pero no publicaron los detalles de los procedimientos de trabajo.

El objetivo del presente trabajo fue el estudio de la evolución de los síntomas de sigatoka negra causada por *M. fijiensis* sobre fragmentos de hojas *in vitro* bajo condiciones controladas (estudio de la epidemiología de sigatoka negra a nivel monocíclico y su efecto sobre los componentes que caracterizan la resistencia parcial).

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo futuro de la comparación de la agresividad de diferentes aislamientos de *M. fijiensis* y de eliminar la influencia ambiental en los ensayos cuantitativos de desarrollo de la enfermedad en diferentes clones, se estudió un procedimiento de inoculación en fragmentos de hojas, similar al desarrollado por El Hadrami *et al.* (1998, 2000) a nivel monocíclico sobre un ciclo de infección, para lo cual se plantaron plantas de los clones Gran enano, FHIA 2, FHIA 18, FHIA 23 y Yangambi Km 5 en macetas dentro de un aislador. Se colectaron fragmentos de la primera hoja completamente expandida de 3,5 x 3,5 cm y se lavaron con agua destilada estéril, luego se colocaron en una placa de Petri con agar-agua + 40 µg.mL⁻¹ de benzimidazol, con el haz de la hoja en contacto con el agar (*Fig. 1A*). Para evitar que los extremos del fragmento de hoja se separaran del agar, se colocó sobre este una lámina transparente plástica estéril del mismo tamaño de la superficie interior de la placa, a la que se le había eliminado un cuadrado de 3 x 3 cm en su centro (*Fig. 1B*), de forma que ese sector de la hoja quedó expuesto para poder realizar las inoculaciones [J. Carlier, comunicación personal].

La superficie expuesta de los fragmentos se inoculó con 50 µL de suspensiones conidiales de *M. fijiensis*. Para determinar las concentraciones de inóculo más adecuadas para el ensayo se inocularon en 10 fragmentos de hoja tomados de los clones Gran enano, FHIA 23, FHIA 18, FHIA 2 y FHIA 21, conidios —procedentes de cultivos de 14 días de edad— a las concentraciones de 0, 4, 8, 12, 20 y 40 conid/cm². Una vez selladas las placas con parafilm se incubaron en un cuarto climatizado (25-27°C) bajo dos tubos de luz fluorescente (*Fig. 1C*). Diariamente se contó el número de lesiones que aparecieron por estadios de evolución (*Figs. 1D y 1E*). Se comparó el número de lesiones en el fragmento inoculado de cada clon a la concentración de 40 conid/cm² de hoja. Se midió además la duración en días de la evolución de los síntomas.

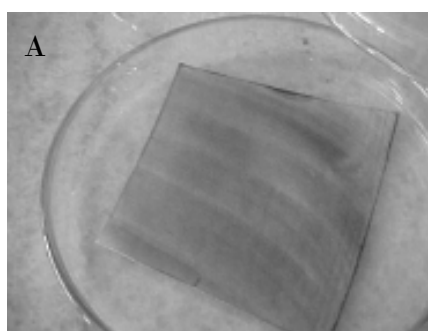
Los resultados de las pruebas monocíclicas en fragmentos se compararon con los de las evaluaciones del de-

sarrollo de la enfermedad en los estudios policíclicos en campo previamente realizados por el primer autor [Hernández y Pérez, 2001].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cualquier procedimiento de inoculación de patógenos para evaluar la reacción de las variedades requiere: *a*) una evaluación previa de la relación entre el número de esporas depositadas por centímetro cuadrado de superficie del hospedante y el número de lesiones que se producen en consecuencia; *b*) demostrar a diferentes cargas de inóculo la tendencia lineal de las curvas para evitar los efectos antagónicos y sinérgicos entre las esporas en relación con la manifestación de la enfermedad; *c*) que la carga de esporas utilizada sea correspondiente en gran medida con la que ocurre naturalmente para poder estimar de forma real cuál será el comportamiento de los genotipos en estudio bajo condiciones naturales [Van der Plank, 1963, 1968].

En todos los experimentos realizados la aparición de síntomas y su evolución en los fragmentos de hojas fue más rápida que en condiciones naturales en los mismos clones en el campo. En las *Figs. 2A, 3A y 4A* aparece la dinámica de aparición de lesiones en relación con el tiempo en el test monocíclico en fragmentos de hojas de Gran enano (altamente susceptible), FHIA 23 (resistencia parcial moderada) y FHIA 2 (alta resistencia parcial), respectivamente, para diferentes concentraciones de inóculo. En el clon Gran enano se observó un incremento del número de lesiones en el tiempo en todas las concentraciones de inóculo. La concentración de 40 conid/cm² de fragmento de hoja inoculada brindó la mayor cantidad de lesiones y se alcanzó a los 20 días hasta 90. En el caso del FHIA 02 también hay un incremento lineal en el tiempo, pero de menor pendiente, por lo que a los 20 días a la concentración de 40 conid/cm² aparecieron 23 lesiones en contraste con más de 90 observadas en el Gran enano. El clon FHIA 23 mostró valores intermedios entre ambos.



Fragmento sobre el agar

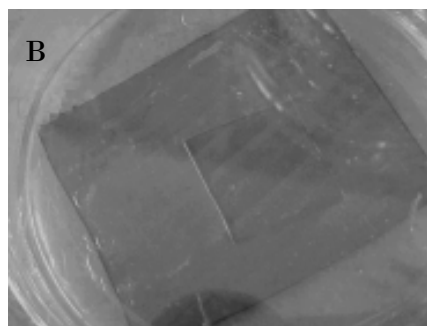
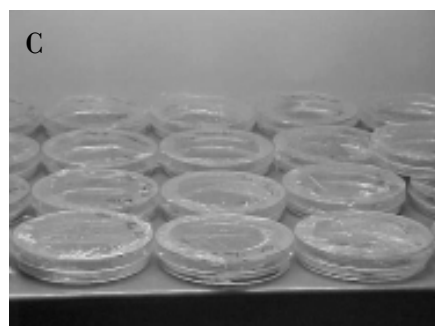
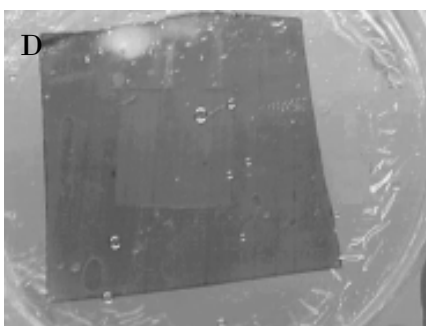


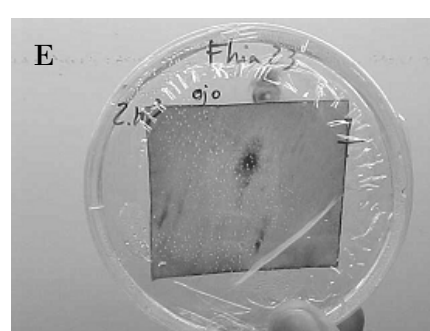
Lámina plástica para evitar separación del fragmento del agar durante incubación.



Placas selladas con parafilm incubando a 27°C bajo dos tubos de luz fluorescente.



Aparición de los primeros síntomas de las lesiones.



Desarrollo de síntomas en diferentes estados.

Figura 1. Fragmentos de hoja en placas con agar + benzimidazol.

En las *Figs. 2B, 3B y 4B* se observa una relación lineal entre la concentración de conidios por centímetro cuadrado inoculados y el número de lesiones que aparecen en los fragmentos de hojas, lo que pone en evidencia una acción independiente de las esporas en la manifestación de la enfermedad. De esta forma en todos los clones la concentración de 40 conid/cm² resultó la más adecuada para la inoculación artificial de los fragmentos sin que ocurra interferencia (sinergismo/antagonismo) entre las esporas. Burt *et al.* (1998) observaron en Centroamérica depósitos de ascosporas en trampas de esporas volumétricas automáticas con una densidad de 40 ascos/cm², por lo que puede considerarse que esta concentración de inóculo se corresponde con la que se

encuentra en condiciones naturales durante los períodos favorables a la enfermedad.

En la *Fig. 5* aparece una comparación de la dinámica de aparición de lesiones en diferentes clones a la concentración de 40 conid/mL en el test monocíclico en fragmentos de hojas. La dinámica de la aparición de lesiones en los fragmentos se correspondió con la manifestación en campo de estudios previos en ensayos policíclicos de campo [Hernández y Pérez, 2001]. Como puede apreciarse, se obtuvo una correspondencia entre el comportamiento frente a la enfermedad en los ensayos de campo policíclicos y lo obtenido en fragmentos de hojas a nivel monocíclico aunque en este último la evolución de los síntomas fue mucho más rápida que como ocurre en condiciones naturales.

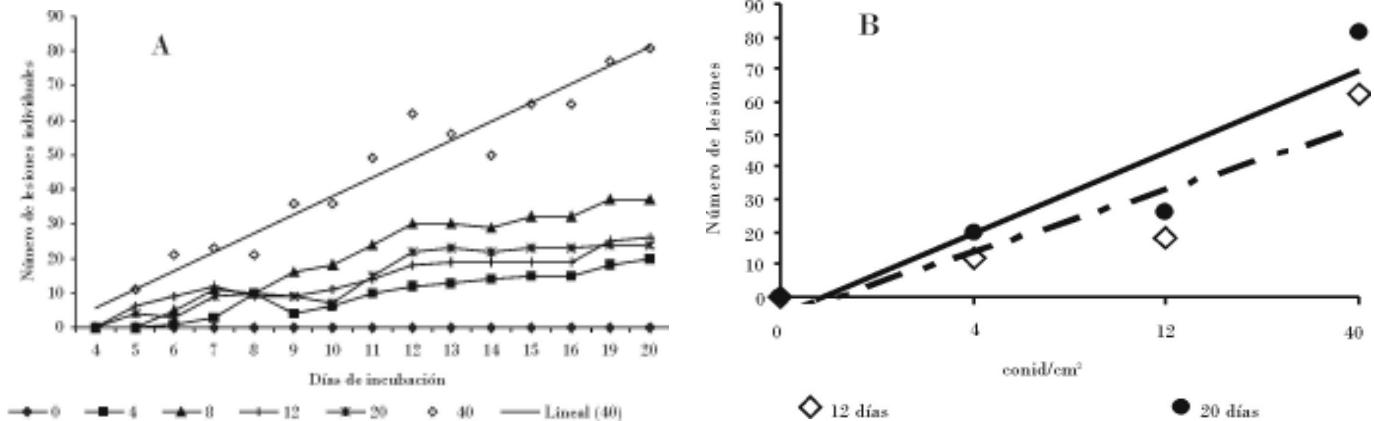


Figura 2. Relación entre la concentración de inóculo y el número de lesiones individuales en el clon Gran enano (altamente susceptible): A) dinámica de la aparición de síntomas en relación con el tiempo; B) relación lineal entre la concentración de inóculo (conidios por centímetro cuadrado) y el número de lesiones individuales en el área inoculada a los 12 y 20 días de incubación.

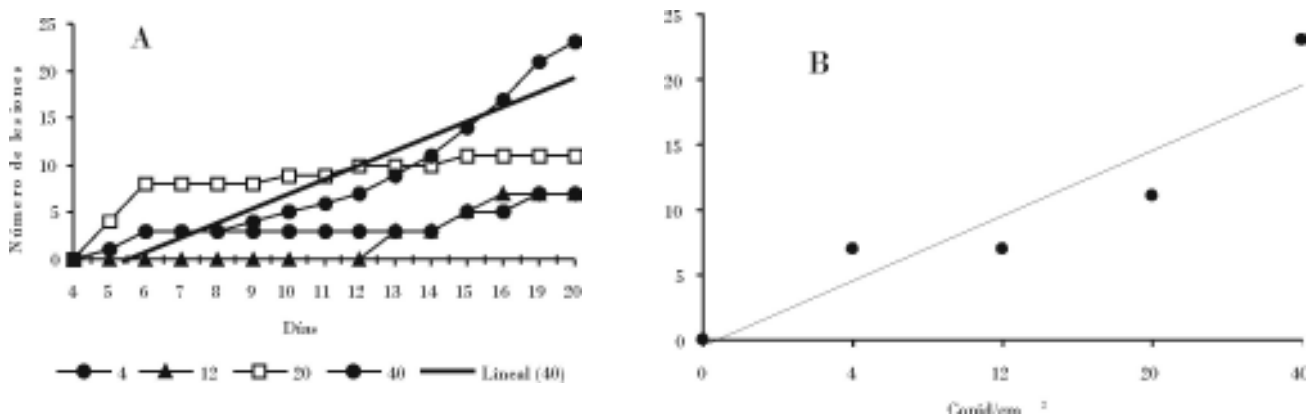
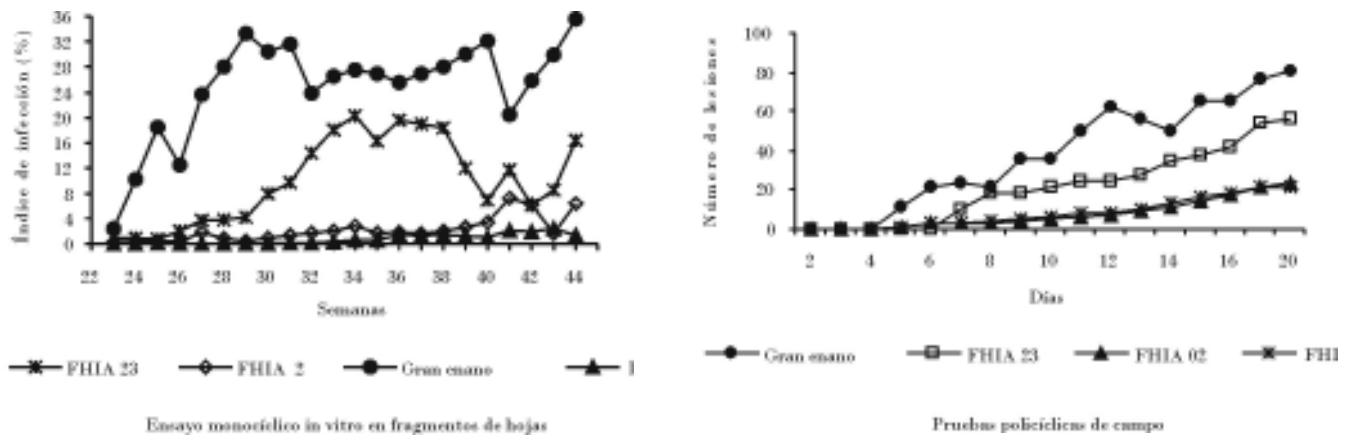
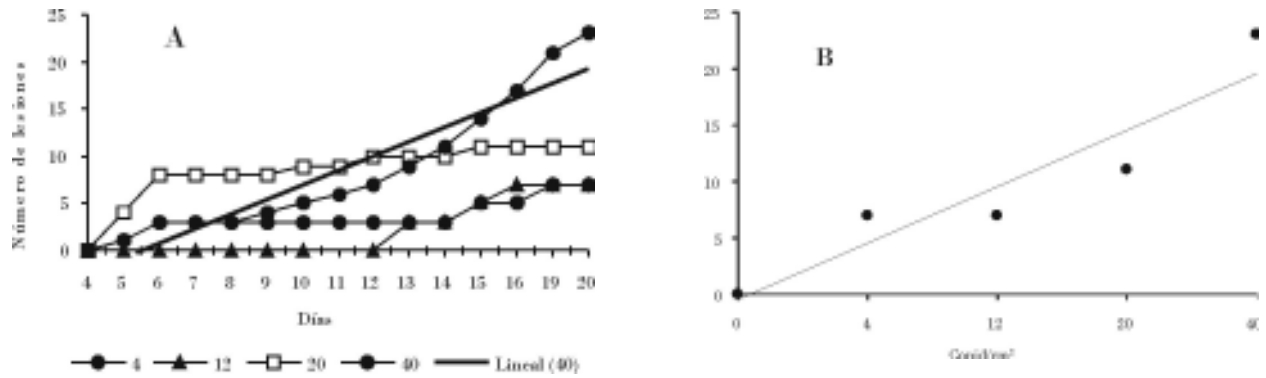


Figura 3. Relación entre la concentración de inóculo y el número de lesiones individuales en el clon FHIA 23 (moderadamente resistente): A) dinámica de la aparición de síntomas en relación con el tiempo en diferentes concentraciones de inóculo; B) relación lineal entre la concentración de inóculo (conidios por centímetro cuadrado) y el número de lesiones individuales en el área inoculada a los 20 días.



En la Fig. 6 aparece la duración de la evolución de los síntomas sobre los fragmentos de hojas de los

clones Gran enano, FHIA 02, FHIA 18, FHIA 21 y FHIA 23.

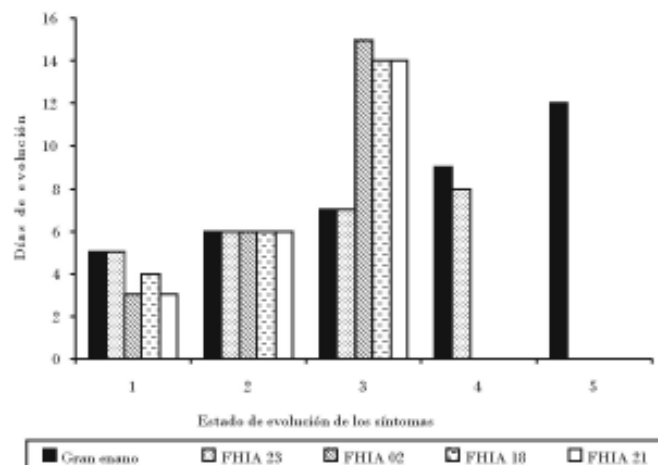


Figura 6. Duración en días de la evolución de los síntomas en los diferentes clones.

Se hizo evidente el efecto de la resistencia parcial sobre la evolución de los síntomas. La evolución de la incubación y de la transición a manchas fue más corta en el Gran enano (altamente susceptible) que en los clones con resistencia parcial, en correspondencia con los informes de Fouré *et al.* (1984 y 1990) y con las observaciones previas en clones FHIA [Hernández y Pérez, 2001]. En el FHIA 18 y el FHIA 21 la evolución de los síntomas hasta el estado 3 fue el doble más larga que en el Gran enano. Pudo observarse la aparición de síntomas 4 en el Gran enano y FHIA 23, y de estado 5 solo en Gran enano. El FHIA 02 detuvo su evolución en el estado 3 de los síntomas, mientras que el FHIA 23 (FHIA 1-1) lo hizo en el estado 4. Se logró mantener durante 25 días las hojas verdes, lo que es insuficiente para poner en evidencia toda la evolución de los síntomas, en especial cuando los clones tienen una resistencia parcial elevada, pues no es posible visualizar los estados más avanzados de los síntomas y la formación de fructificaciones.

Los resultados muestran la potencialidad del ensayo en fragmentos de hojas para la evaluación de la reacción de resistencia parcial de clones de bananos; sin embargo, como aspecto negativo hay que considerar que muestra variación de la supervivencia de los fragmentos de hojas, aún provenientes de una misma hoja, por lo que debe continuarse el estudio en el futuro de los factores que inciden en esto para la optimización del ensayo y poder evaluar la producción potencial de cuerpos fructíferos.

Es por primera vez que se documentan las condiciones específicas para la conducción de los ensayos en fragmentos de hojas. Los informes anteriores de El Hadrami *et al.* (1998, 2000) no establecen las condiciones específicas para desarrollarlos.

CONCLUSIONES

- La evolución de la enfermedad es más rápida en los fragmentos de hojas *in vitro* que la ocurrida en las plantas en campo.
- La curva del desarrollo de lesiones con el tiempo en un ciclo de infección en los fragmentos de hojas de los diferentes clones muestra una alta correspondencia con la curva de desarrollo policíclico de la enfermedad en relación con el tiempo en el campo, por lo que es posible estimar el nivel de resistencia parcial de los clones a partir de este ensayo.

- Este método puede utilizarse para comparar la agresividad en un solo ciclo infectivo de diferentes poblaciones de *M. fijiensis* bajo condiciones controladas de inoculación, así como para evaluar el nivel de la resistencia parcial de los clones al patógeno, basada en la velocidad de evolución de las lesiones. Ello requiere posterior afinamiento para lograr alargar la vida verde de los fragmentos con el objetivo de observar la reproducción sexual del patógeno en las manchas.

Los autores desean hacer constar y expresar su agradecimiento al INIBAP por financiar parte de los estudios realizados; al doctor J. Carlier por las sugerencias realizadas en relación con la metodología del ensayo; al estimado amigo, ya fallecido, doctor Rodolfo Maribona, por su acogida en el Laboratorio de Fitopatología del CIBE en la ESPOL en Guayaquil, donde se replicaron parte de los ensayos durante un entrenamiento ofrecido por el primer autor a investigadores de esa institución.

REFERENCIAS

- Burt, P. J. A.; J. Rutter; F. Ramirez: «Airborne Spore Loads and Mesoscale Dispersal of the Fungal Pathogens Causing Sigatoka Diseases in Banana and Plantain», *Aerobiology* 14:209-214, 1998.
- El Hadrami, A.; M. F. Zapater; F. Lapeyre; C. Abadie; J. Carlier: «Evaluation sur fragments foliaires en survie de la résistance partielle du bananier et de l'agressivité de *Mycosphaerella fijiensis* agent causal de la cercosporiose noire», CIRAD-FLHOR, Montpellier, Francia, FA176790, INIBAP's data base Musalit 2001, 1998.
- El Hadrami, A.; C. Abadie; J. Carlier: «Evaluation de la résistance partielle des bananiers à *Mycosphaerella fijiensis* (maladie des raies noires) en conditions contrôlées et au champ», Journées Jean Chevaugnon, Rencontres de Mycologie-phytopathologie, Aussois, Francia, 2000/03/05-09, 1p, INIBAP's database Musalit 2001, 2000.
- Firman, I. D.: «Susceptibility of Banana Cultivars to Fungus Diseases in Fiji», *Trop. Agric. Trinidad*, 49:189-196, 1972.
- Fouré, E.; A. Mouliom-Pefoura; X. Mourichon: «Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ des bananiers et des plantains appartenant au divers groupes génétiques», *Fruits* 45:339-345, 1990.
- Fouré, E.: «Leaf Spot Diseases of Bananas and Plantain Caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis*», The Improvement and Testing of *Musa*: a Global Partnership. Proceedings of the First Global Conference of the International *Musa* Testing Program, INIBAP, Held at FHIA, Honduras, April 27-30, 1994.
- Fouré, E.; M. Grisoni; R. Zurfluh: «Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. II. Etude de la sensibilité des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet et des quelques caractéristiques biologiques de la maladie des raies noires au Gabon», *Fruits* 39:365-378, 1984.
- Hernández, A.; L. Pérez: «Reaction of Banana and Plantain Cultivars to Black Sigatoka Caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Epidemiological components of the resistance», *Fitosanidad* 5 (3):9-16, 2001.
- Pérez, L.: «Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de

Ensayo en fragmentos de hojas...

- bananos y plátanos (*Musa spp.*) en Cuba. Biología, epidemiología y manejo integrado de la enfermedad», Simposium Internacional sobre sigatoka negra, Manzanillo, Colima, México, 8-10 de julio de 1998.
- Pérez, L.; J. M. Álvarez; M. Pérez: «Economic Impact and Management of Black Leaf Streak Disease in Cuba», *Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook. Proceedings of the International Workshop on Mycosphaerella Leaf Spot Diseases*, San José, Costa Rica, 2002, pp. 71-83.
- Rowe, P.: «Latest Developments in the FHIA Banana and Plantain Breeding Program: Bred Hybrids Are Now Being Grown Commercially», Memorias del Seminario Internacional sobre Producción de Plátano, Armenia Quindío, Colombia, 4-8 de mayo de 1998.
- Meredith, D. S.; J. S. Lawrence: «Black Leaf Streak of Bananas (*Mycosphaerella fijiensis*). Susceptibility of Cultivars», *Trop. Agric. Trinidad*, 47:275-287, 1970.
- Van der Plank, J. E.: *Plant Disease Epidemiology*, Academic Press New York, 1963, pp.180-181.
- : *Disease Resistance In Plants*, Academic Press New York, 1968.
- Vidal, A.: «Sigatoka negra en Cuba. En nuevos focos de plagas y enfermedades», *Boletín Fitosanitario*, FAO 40:1-2, 1992.