

## Evaluación temprana y en condiciones de campo de la resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de plantas del cv. Gran enano (AAA) obtenidas a través del cultivo de tejidos y la inducción de mutaciones

Lourdes García Rodríguez\*, Juan Pérez Ponce, Pedro Orellana Pérez, Idalmis Bermúdez Caraballoso, Novisel Veitía Rodríguez, Michel Leiva Mora, Yelenys Alvarado Capó, Carlos Romero Quintana, Mayra Acosta Suárez.

\*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: lougarcia@ibp.uclv.edu.cu

### RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas, perteneciente a la Universidad Central de las Villas. El material vegetal utilizado proveniente del cv. Gran Enano (AAA) fue tratado con agentes mutagénicos físicos (radiaciones gamma, fuente  $^{60}\text{Co}$ ), para inducir variabilidad genética. Se evaluó el comportamiento de la población frente a la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Un somaclón seleccionado por su resistencia en campo, fue multiplicado *in vitro* y las plantas aclimatizadas durante 50 días para evaluar su comportamiento frente a la enfermedad en condiciones de casa de cultivo mediante la aplicación de homogeneizado micelial de *M. fijiensis* y en un segundo ciclo de multiplicación en campo. Los resultados mostraron que en la mayoría de las plantas no se encontraron diferencias respecto al cv Gran Enano (AAA), solamente una expresó resistencia frente a la enfermedad de forma similar al cv. 'FHIA 18' (AAAB) (parcialmente resistente) en cuanto a las variables evaluadas, obteniéndose una frecuencia de 0.018% para este carácter. Esta planta fue nombrada IBP 446. A los 60 días de la aplicación del homogeneizado micelial de *M. fijiensis* en plantas micropropagadas de este somaclón, se encontraron diferencias en los grados de afectación respecto al control susceptible (Gran enano) en la casa de cultivo. Cuando se evaluaron plantas del somaclón IBP 446 en un segundo ciclo de multiplicación en campo se encontraron diferencias con el control susceptible solamente en la floración, mientras que se comportaron similares en la cosecha.

Palabras clave: detección precoz, mejoramiento, mutaciones, Sigatoka negra

### ABSTRACT

The present work was carried out in the Plants Biotechnology Institute of the Central University of Las Villas. The plant material from the cv. Grande Naine (AAA) was treated with physical mutagenic agents (gamma radiation  $^{60}\text{Co}$  source) to induce genetic variability. The behaviour of the population to the black Sigatoka was evaluated. A somaclone was selected by its disease resistance and was *in vitro* multiplied and the plants were acclimatized to evaluate its behaviour facing the disease on greenhouse conditions and in a second cycle of multiplication in the field. The results showed that in the majority of the plants were not found differences respect cv Grande Naine, just one presented similar reaction to cv. 'FHIA 18' (AAAB) (partially resistant) as for the variable evaluated, being obtained a frequency of 0.018% for this character. This plant was named IBP 446. After 60 days of application of the mycelial homogenized of *M. fijiensis* in micropropagated plants of this somaclone, differences in the respect affectation states were found at susceptible witness in greenhouse conditions. When plants of the IBP 446 were evaluated in a second cycle of multiplication differences were found with the susceptible control only at flowering, while they behaved similar at susceptible control in the crop.

Key words: early detection, breeding, mutation, Black Sigatoka

### INTRODUCCIÓN

El cv. 'Gran Enano', que es un triploide *Musa acuminata* (AAA) del subgrupo Cavendish, se encuentra dentro de los cultivares de fruta más ampliamente consumidos en el mundo (Roux, 1998). Sin embargo la producción de este cultivar, al igual que la mayoría del género *Musa* está seriamente afectada por la incidencia de plagas y enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos (Arias, 1998), destacándose en estos últimos años la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) (Pérez, 1998).

La única vía de solución para reducir los daños de esta enfermedad es la búsqueda de variedades resistentes (Pérez, 1998).

El mejoramiento genético a través de cruzamientos de los bananos y plátanos es extremadamente dificultoso debido a que la mayoría son triploides, estériles y con frutos partenocárpicos, por lo que la utilización de técnicas biotecnológicas entre las que se destacan: la mutagénesis *in vitro*, la transformación genética de plantas y la biología molecular son herramientas muy útiles para este cultivo (Donini y Sonnino, 1998; Nichterlein, 2000).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la reacción frente a *Mycosphaerella fijiensis* de plantas del cv. Gran enano, obtenidas a partir del programa de mejoramiento genético mediante el cultivo de tejidos y la inducción de mutaciones en diferentes condiciones de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Como materiales vegetales de partida se utilizaron ápices del cv. Gran Enano, obtenidos de hijos tipo espada con un tamaño aproximado de 50 a 100 cm de altura que fueron establecidos *in vitro* de acuerdo con la metodología propuesta por Orellana (1994). Para la inducción de yemas adventicias se utilizó el protocolo propuesto por García (2002).

- Los explantes de 1 mm<sup>2</sup> provenientes de yemas adventicias fueron tratados con 25 Gy de radiaciones gamma mediante el uso de una fuente <sup>60</sup>Co con una potencia de 1.98 Gy.min<sup>-1</sup>.
- Se regeneraron 6 000 plantas que fueron aclimatizadas según el instructivo técnico para la microrpropagación del plátano (MINAG, 1992).

### Evaluación de la reacción de las plantas del cv. Gran Enano a la Sigatoka negra en campo

Las fases de evaluación en campo se realizaron en la Estación Experimental de Remedios "Pedro Lantigua" (primer ciclo en campo) y en la Empresa de Cultivos Varios de Quemado de Güines (segundo ciclo de multiplicación en campo). La distancia de plantación fue 3.0x2.0 m y todas las atenciones culturales se llevaron a cabo según el instructivo técnico para el cultivo del plátano (MINAG, 1994).

Se tomaron los valores de temperatura (máxima, media y mínima), humedad relativa y precipitación de la región donde se encontraban las plantas.

Se consideró cada planta como un individuo experimental y se realizaron evaluaciones de la enfermedad a partir de la floración hasta la cosecha. Se evaluaron además plantas del cv. FHIA 18 (AAAB) como control resistente y del cv. Gran Enano (AAA) como control susceptible, registrándose las siguientes variables:

- \_ Hoja más joven manchada (HMJM) (Orjeda, 1998),
- \_ Número de hojas erectas (NHE),
- \_ Número de hojas totales (NHT),
- \_ Número de hojas funcionales (NHF).

Se seleccionó una planta con un comportamiento superior en cuanto a la incidencia de la enfermedad denominándose IBP 446.

### Evaluación de la resistencia del somaclón IBP 446 frente a la Sigatoka negra en casas de cultivo

Empleando la metodología propuesta por Orellana (1994) se micropropagaron vitroplantas del somaclón IBP 446, las que fueron aclimatizadas como se describió anteriormente.

A los 45 días de adaptadas las plantas en la casa de cultivo se seleccionaron aquellas que presentaban una altura promedio de 30 cm y no menos de cuatro hojas activas, las cuales fueron transplantadas a bolsas. Se utilizaron como controles el cv. Gran Enano y el cv. FHIA 18 como patrones susceptible y resistente respectivamente.

La preparación del inóculo de *M. fijiensis* y la evaluación de la enfermedad se realizó según la metodología propuesta por Leiva (1998). Se tomaron 15 plantas por cada somaclón, así como de los controles utilizados. Las plantas inoculadas fueron mantenidas con una humedad relativa del 95 al 100% las primeras 72 horas. A partir del cuarto día la humedad relativa se mantuvo por encima del 50 % durante el día, mientras que por la noche fue saturante (100%).

Las evaluaciones se realizaron a los 30, 45 y 60 días de inoculadas las vitroplantas, según la escala propuesta por Alvarado *et al.* (2002).

Para el procesamiento estadístico de la variable grado de afectación se aplicó la prueba no paramétrica (Pruebas de Kruskal-Wallis), complementándose con una comparación múltiple no paramétrica de medias de rango. Se empleó el paquete de programas STATISTIX ver. 1.0 sobre Windows.

### Evaluación de la resistencia del somaclón IBP 446 frente a la Sigatoka negra en el segundo ciclo de multiplicación en campo

Con el objetivo de evaluar el comportamiento del somaclón IBP 446 en un segundo ciclo de multiplicación y en otro ambiente, se plantaron 30 hijos conjuntamente con los controles susceptible 'Gran Enano' (AAA) y resistente 'FHIA 18' (AAAB) en un experimento completamente aleatorizado en el área de Quemado de Güines.

Se evaluaron a los seis meses, al florecimiento y al momento de la cosecha las variables siguientes:

- \_ Hoja más joven manchada (HMJM),
- \_ Número de hojas erectas (NHE),
- \_ Número de hojas totales (NHT),
- \_ Número de hojas funcionales (NHF),
- \_ Número de manos y dedos por racimo,
- \_ Peso del racimo.

Para el procesamiento estadístico, los valores del HMJM y NHF fueron transformados por la fórmula  $\sqrt{x+1}$ , se realizaron análisis de varianza de clasificación simple. Para determinar los grupos homogéneos y/o significativamente diferentes, a un

nivel de 5.0%, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan o Dunnett's C, esta última cuando no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los datos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de la reacción de las plantas del cv. Gran Enano a la Sigatoka negra en campo

En las evaluaciones realizadas dentro del área de la población objeto de estudio no se encontraron diferencias respecto a la respuesta a *M. fijiensis* en las plantas, lo cual evidenció una uniforme difusión de la enfermedad en el campo experimental. Las condiciones climáticas presentes en la zona favorecieron la aparición y evolución de la enfermedad. Se registró como promedio una temperatura de 22.6 °C, una humedad relativa de 79% y precipitaciones de 30 mm, en el período comprendido desde febrero a mayo.

En la mayoría de las plantas no se encontraron diferencias respecto al cv Gran Enano o sea, eran altamente susceptibles a la enfermedad, solamente una expresó resistencia a la enfermedad de forma

similar al cv. 'FHIA 18' en cuanto a la hoja más joven manchada (HMJM) y demás variables evaluadas (Tabla 1), obteniéndose una frecuencia de 0.018 % para este carácter. Esta planta se denominó IBP 446.

Las afectaciones por Sigatoka negra (hoja +3) en el somaclón IBP 446 y una planta del cv. 'Gran Enano' se observan en la figura 1.

Benchamas y Narong (1990) en plantas provenientes de brotes irradiados con 10 y 20 Gy encontraron, que la mayoría de los clones irradiados mostraron susceptibilidad a *M. fijiensis* similar al control. Sin embargo, algunas diferencias en cuanto a la apariencia de la lesión y el amarillamiento del área foliar fueron observadas y se seleccionaron algunas líneas que mostraban menor número de lesiones y más pequeñas. Mientras que en trabajos realizados por Pérez y Orellana (1994) no se encontró resistencia a Sigatoka negra, cuando se evaluaron más de 50 000 plantas del cv. 'Gran Enano' provenientes de brotes irradiados con radiaciones gamma. Similares resultados fueron obtenidos por Cardona *et al.* (2000) cuando brotes de 'Dominico hartón' (AAB) fueron tratados con 25 Gy de radiaciones gamma ( $^{60}\text{Co}$ ).

Tabla 1. Incidencia de la Sigatoka negra a los 90 días de la emisión del racimo en el somaclón IBP 446 y los controles.

Planta	HMJM	NHE	NHT	NHF
Gran Enano	2	4	7	3
IBP 446	5	8	8	7
FHIA 18	6	10	10	8

\_ HMJM Hoja más joven manchada \_ NHE Número de hojas erectas \_ NHT Número de hojas totales \_ NHF Número de hojas funcionales.

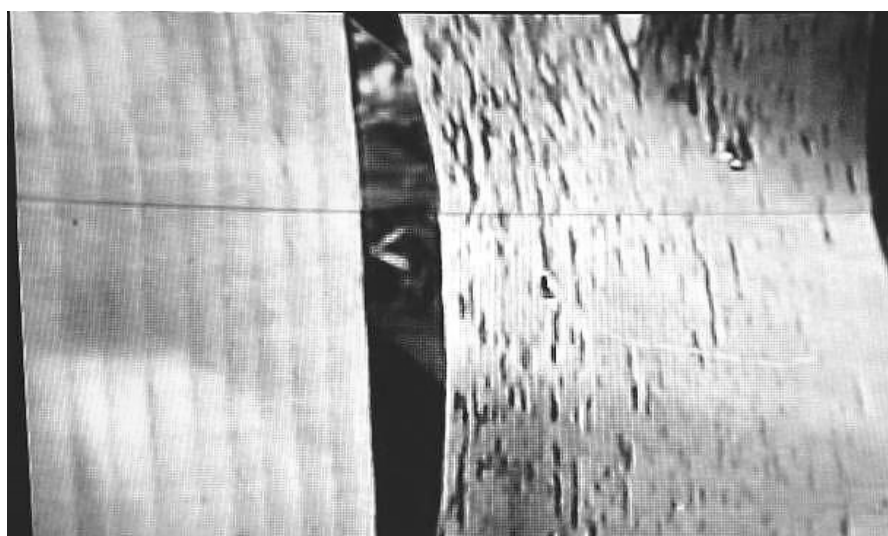


Figura 1. Afectaciones por Sigatoka negra a los 90 días de emitido el racimo, en la hoja +3 del somaclón IBP446 (Izquierda) y una planta del cv. Gran Enano (Derecha).

Los resultados obtenidos revelaron la posibilidad de encontrar plantas en el cv. 'Gran Enano' con una respuesta diferencial a la enfermedad empleando radiaciones gamma en yemas adventicias, aún cuando el tamaño de la población fue relativamente bajo para seleccionar individuos con resistencia a esta enfermedad. La cantidad de material vegetal para ser tratado y el número de plantas a evaluar son aspectos importantes a tener en cuenta. En la práctica, el tamaño de la población está basado en la frecuencia de un evento mutacional para un locus específico de interés. La resistencia a virus y enfermedades es menos común que otros caracteres, requiriéndose incrementar de 10 a 20 veces el tamaño de las muestras tratadas (Donini y Sonnino, 1998).

#### **Evaluación de la resistencia del somaclón IBP 446 frente a la Sigatoka negra en casas de cultivo**

Se pudo comprobar que el homogeneizado micelial es un inóculo artificial adecuado para la expresión

de los síntomas en condiciones de casas de cultivo, corroborando el resultado obtenido en el primer ciclo de multiplicación en campo en cuanto al comportamiento de este somaclón frente a *M. fijiensis*. El cv. Gran Enano resultó ser el más afectado (Tabla 2). Los síntomas consistieron en manchas elípticas o redondeadas, las cuales pueden explicarse por la diferenciación incompleta de los tejidos foliares de las vitroplantas cuyo desarrollo limitado y la diferenciación de las nerviaciones foliares actuaron como barrera ante el avance de las hifas del hongo (Mourichon *et al.*, 2000).

A los 30 y 45 días no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero ya a los 60 días se encontraron diferencias entre el somaclón y el control resistente respecto al cultivar susceptible utilizado, en cuanto al estado de los síntomas.

Tabla 2. Medias de los estados de los síntomas provocados por el homogeneizado micelial de *M. fijiensis* en las plantas de Musa evaluadas en casas de cultivo.

Cultivar	Evaluaciones (Días)					
	30		45		60	
	M.R.	M.Ra.	M.R.	M.Ra.	M.R.	M.Ra.
Gran Enano	2.36	34.4 a	4.13	37.8 a	4.63	40.1 a
	2.21	29.5 a	3.66	27.7 a	4.22	25.9 b
	2.22	27.6 a	3.69	26.0 a	4.09	25.5 b

M. R. Medias reales

M. Ra. Medias de rango

Medias de rango con letras no comunes en una columna difieren por prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para  $P < 0.05$ .

Varios autores han logrado establecer diferencias entre cultivares, en cuanto a su reacción a la Sigatoka negra. Mourichon *et al.* (1987) realizaron inoculaciones utilizando conidios en hojas de vitroplantas de tres cultivares de *Musa* spp., los cuales presentaban diferente sensibilidad al hongo; a partir de los 38 días de iniciado el experimento lograron encontrar diferencias entre los cultivares estudiados. Resultados similares obtuvo Hernández (1995) cuando evaluó cultivares del subgrupo Cavendish frente al cultivo filtrado de *M. fijiensis*. Mientras Harelimana *et al.* (1997) no encontraron correspondencia entre la alta resistencia de algunos cultivares y el comportamiento frente al cultivo filtrado.

Con estos resultados se pudo comprobar que el homogeneizado micelial, es un inóculo artificial adecuado para evaluar la expresión de la resistencia entre somaclones y cultivares de *Musa* spp., corroborando lo plantado por Leiva (1998) y Alvarado *et al.* (2002). Leiva *et al.* (2002) evaluaron dos cultivares tratados con diferentes inóculos de *M.*

*fijiensis* en casas de cultivo, encontrando que el homogeneizado micelial resultó ser el inóculo más adecuado, por el método de preparación y características del mismo, para lograr una expresión uniforme de los síntomas en estas condiciones.

#### **Evaluación de la resistencia del somaclón IBP 446 frente a la Sigatoka negra en el segundo ciclo de multiplicación**

En el segundo ciclo se observó que las plantas del somaclón IBP 446, aunque presentaron una respuesta a la enfermedad similar al cv. 'FHIA 18' a los seis meses y en la emisión del racimo, en la cosecha estas diferencias desaparecieron y el comportamiento del somaclón, en cuanto al número de la hoja más joven manchada, fue muy similar al cultivar susceptible (Tabla 3), no pudiendo llenar los dedos en el racimo. El seguimiento de la evolución de esta enfermedad es muy conveniente, en cualquier material vegetal nuevo con resistencia a dicha enfermedad, para determinar su estabilidad en el tiempo (Guzmán *et al.*, 2000).



Tabla 3. Reacción del somaclón IBP 446 frente a la Sigatoka negra en el segundo ciclo de cultivo.

Planta	Seis meses				Emisión del racimo				Cosecha			
	HMJM		NHF		HMJM		NHF		HMJM		NHF	
	Media real	Media transf.	Media real	Media transf.	Media real	Media transf.	Media real	Media transf.	Media real	Media transf.	Media real	Media transf.
IBP 446	6.0	2.64 ab	7.1	2.84 a	6.5	2.73 a	7.20	2.76 b	0.8	1.31 b	1.55	1.51 b
Gran E.	5.5	2.54 b	6.6	2.75 b	5.0	2.43 b	5.25	2.47 c	0.6	1.23 b	1.35	1.44 b
FHIA 18	6.25	2.69 a	7.35	2.88 a	6.95	2.81 a	9.25	3.19 a	5.15	2.46 a	7.40	2.89 a
EE		±0.04*		±0.029		±0.06 *		±0.07 *		±0.06		0.14 *

HMJM Hoja mas joven manchada \_ NHF Número de hojas funcionales

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por Duncan o Dunnett 'C' para  $p < 0.05$ .

Una vez emitida la inflorescencia, las plantas dejaron de emitir hojas comenzando el proceso de traslocación de nutrientes a la inflorescencia, por consiguiente las hojas se tornan débiles y susceptibles a las enfermedades (Pérez, 1998). Este proceso acompañado de un efecto favorable de las condiciones climáticas en el período de julio-septiembre (temperatura 27°C, humedad relativa 83.8% y precipitación acumulada de 51.66 mm) propició el desarrollo de la enfermedad y permitió su diseminación por toda el área foliar de las plantas. Todo esto, sumado al hecho de no tener el área ningún control químico contra la enfermedad, no permitió un número óptimo de hojas para la producción de un buen racimo, lo cual se tradujo en racimos de peso disminuido, ya que el número de hojas funcionales al momento de la floración y su persistencia a través del período de llenado del fruto son críticos en la determinación del rendimiento de *Musaceas* (Coto *et al.*, 1995).

Fouré (1994) consideró que existen dos tipos de interacción entre los cultivares de *Musa* y *M. fijiensis*: una interacción incompatible o extrema resistencia y una interacción compatible de desarrollo de las lesiones. Todos los híbridos de la FHIA presentan el segundo tipo de reacción. En ellos la resistencia a la enfermedad se expresa por un alargamiento del ciclo, la reducción del tamaño de las lesiones y de la capacidad de producción de esporas (Pérez, 1998) lo que les permite completar su ciclo hasta la cosecha con más de seis hojas sin manchas en los tipos más resistentes (FHIA 02, FHIA 03 y FHIA 18) y con más de tres hojas en FHIA 23 y el SH 3436. Mientras que otros como el FHIA 04 expresaron resistencia solamente hasta el florecimiento (Jones, 1994). En experimentos realizados en Cuba plantas de FHIA 04 presentaron en la floración 12 hojas funcionales y tres con manchas, mientras que en la cosecha solamente contaron con 1.3 hojas funcionales y todas sus hojas con manchas (Orellana, 2001, comunicación personal). Cultivares originados desde Brasil (PV03-44 y PA03-22) presentaron este mismo

comportamiento (INIBAP, 1998). Resultados similares se apreciaron en las plantas del somaclón IBP 446.

La herencia de la resistencia a la Sigatoka negra es el resultado de la interacción entre alelos recesivos de un locus mayor ( $bs_1$ ) y aquellos de al menos dos genes menores independientes con efectos aditivos ( $bs_1$  y  $bs_2$ ) (Ortiz y Vuylsteke, 1994; Craenen y Ortiz, 1996; Mourichon *et al.*, 1997; Carrel *et al.*, 1999). En cultivares diploides es necesario un genotipo que presente homocigosis recesiva en estos genes para lograr resistencia a la enfermedad, mientras que los alelos  $bs_1$  no son suficientes para producir genotipos menos susceptibles y en un genotipo homocigótico  $bs_1$  solo o en combinación con un solo homocigótico para  $bs_2$  no resulta en una resistencia parcial, aunque estos fenotipos tienen una respuesta menos susceptibles (Ortiz y Vuylsteke, 1994). Por un simple evento mutacional es muy difícil cambiar el estado alélico de estos tres genes para lograr resistencia al patógeno, pero sí se puede cambiar el estado alélico de al menos uno que influirá en la reacción de la planta a la enfermedad.

## REFERENCIAS

- Alvarado Y, Leiva M, Dita M, Acosta M, Cruz M, Portal N, Gómez R, García L, Bermúdez I (2002) Early evaluation of Black leaf streak resistance on *Musa* spp. Breeding programme by the use of mycelium suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. 2<sup>nd</sup> International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. Costa Rica. 20-23 May- 2002. Pp 48
- Arias O (1998) Current advances in the biotechnology of banana. En: C. Ives y B. Bedford (Edts.). Agricultural Bioethnology in International Development. CAB International Pp. 54-62 Wallingford, Oxon.
- Benchamas S y Narong S (1990) Induced mutations for leaf-spot Disease Resistance in Hom Thong Banana. En: *In vitro* mutation breeding of banana and plantains I. Report of the first research co-ordination meeting for the FAO/IAEA coordinated research programme on mutation breeding of bananas and plantains. Austria. P.79
- Cardona TC, Yepes GG y Castaño J (2000) Severidad de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y Sigatoka

- amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach) en *Musa balbisiana* (AAB) cv. Dominico hartón sometido a irradiación con Co 60. INFOMUSA 9 (2): 17-19
- Carrel F, Abadie C, Carlier J Tomekpe PJ. 54-62, Lagoda JL y Frédéric Bakry (1999) Confección de mapas del genoma y análisis genético de la resistencia a la Sigatoka negra en el banano. INFOMUSA 8 (1)
- Coto J, Rosales FE, Rowe P, Rivera JM (1995) Reacción a Sigatoka negra y comportamiento agronómico de plátanos híbridos (AAAB) sometidos a desmane. En: Memorias XI Reunión ACORBAT. Costa Rica. 1994
- Craenen K y Ortiz R (1996) Effect of the black sigatoka resistance locus  $bs_1$  and ploidy level on fruit and bunch traits of plantain-banana hybrids. Euphytica 87: 97-101
- Donini P y Sonnino A (1998) Induced Mutation in Plant Breeding: Current Status and Future Outlook. En: Jain, SM (Edt.). Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. pp.255-29. Kluwer Academic publisher. Dordrecht/Boston/London
- Fouré E (1994) Leaf spot Diseases of banana and plantain caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis*. En: Dr Jones (Ed.). The Improvement and Testing of *Musa*: a Global Partnership. Proceedings of the First Global Conference of the International *Musa* Testing Program held at FHIA, Honduras 27-30 abril. pp. 37-46
- García L (2002) Empleo de yemas adventicias y radiaciones gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) en la inducción de variabilidad en banano (*Musa* sp.) cv. Gran Enano. Tesis en opción del grado científico de Dr en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. P 102
- Guzmán M, Murillo G y Villalta R (2000) Estabilidad de la resistencia a la Sigatoka negra en híbridos de banano (*Musa* AAAA) con un nivel intermedio de resistencia al patógeno. Informe Anual. Corbana 1: 27-48
- Harelimana G, Lepoivre PH, Jijakli H y Mourichon X (1997) Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black leaf streak. Euphytica 96: 125-128
- Hernández, R (1995) Selección *in vitro* e invernadero de clones de *Musa* sp. para la evaluación de su resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Tesis para optar por el grado de Magister Scientiae. Turrialba. Costa Rica. P 107
- INIBAP (1998) Annual Report Networking Banana and Plantain: INIBAP 1997. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, pp. 38-43. Montpellier, France.
- Jone DR (1994) International *Musa* Testing Program Phase I. En: Dr. Jones (Ed.). The Improvement and testing of *Musa*: a Global Partnership. Proceedings of the First Global Conference of international *Musa* Testing Program held at FHIA, Honduras 27-30 abril. Pp 12-20
- Leiva M (1998) Estudio de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet para la diferenciación de genotipos de *Musa* spp. en invernadero. Trabajo de Diploma. p 3-43
- Leiva MM, Dita MR, Alvarado YC, Acosta MS, García L, Bermúdez I (2002) Empleo de diferentes inóculos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de invernadero para evaluar el comportamiento de dos cultivares de banano. INFOMUSA vol. 11 no. 2: 41-42
- MINAG (1992) Instructivo Técnico para la micropropagación del Plátano en Biofábricas.
- MINAG (1994) Instructivo Técnico del Plátano
- Mourichon X, Peter D, Zapater M (1987) Inoculation experimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur jeunes plantules de bananier issue de culture *in vitro*. Fruits 45 (4): 195-198
- Mourichon X, Carlier J y Fouré E (1997) Enfermedades de *Musa*: Hoja divulgativa N.º 8
- Mourichon X, Lepoivre P, Carlier J (2000) Host-pathogens interactions. En: D.R.Jones (ed.). Fungal disease of the foliage. Disease of banana, abaca, and enset. pp. 67-72 CAB International.
- Nichterlein K (2000) Workshop on Mutation and *in vitro* culture techniques for the improvement of vegetatively propagated tropical food crops. Curso FAO/IAEA/UCR. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. P. 56
- Orellana PP (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis en opción del Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Cuba. P. 120
- Orjeda G (1998) Evaluación de la resistencia de los bananos a las enfermedades de Sigatoka y marchitamiento por *Fusarium*. Guías técnicas INIBAP 3 Instituto internacional de los recursos fitogenéticos, Roma, Italia; Red internacional para el mejoramiento del banano y el plátano, Montpellier, Francia
- Ortiz R y Vuylsteke D (1994) Inheritance of black Sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa* spp.) hybrids. Theor. Appl. Genet. 89: 156-162
- Pérez LV (1998) Control de la Sigatoka negra en Cuba: Un enfoque de manejo integrado de la enfermedad. INFOMUSA 7(1):26-30
- Pérez JP y Orellana P (1994) *Musa* Improvement in Cuba. En: Jones, D.R. (Ed.) The Improvement and Testing of *Musa*: a Global Partnership. Proceedings of the First Global Conference of the International *Musa* Testing Program held at FHIA, Honduras. Pp. 203-206
- Roux N (1998) Improved methods to increase diversity in *Musa* using mutation and tissue culture techniques. En: Cellular biology and biotechnology including mutation techniques for creation of new useful banana genotypes. Report of the Second Research Co-ordination Meeting of FAO/IAEA/BADC Co-ordinated Research Project, held in Kuala Lumpur, Malaysia