

## Relación entre caracteres fenotípicos de plantas de 'Grande naine' y 'Calcutta 4' cultivadas *in vitro* y su respuesta a la inoculación con *Mycosphaerella fijiensis* en casa de cultivo

Cynthia Sánchez-García\*, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Michel Leiva-Mora y Berkis Roque. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: cyn@ibp.co.cu

### RESUMEN

Aunque se ha planteado que la resistencia de algunas variedades de *Musa* sp. a la Sigatoka negra está relacionada a la presencia de barreras físicas asociadas a la anatomía foliar, aun es limitado el conocimiento de dicha relación en algunos genotipos de *Musa*. Es por esta razón que el objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre caracteres fenotípicos de plantas de 'Grande naine' y 'Calcutta 4' cultivadas *in vitro* y su respuesta a la inoculación con *Mycosphaerella fijiensis* en casa de cultivo. Se describieron morfológicamente plantas de 'Calcutta 4' (resistente) y 'Grande naine' (susceptible) en casa de cultivo y se determinó el grosor, la densidad estomática y el contenido de lignina constitutiva en hojas de plantas de ambos genotipos. Se evaluó además el desarrollo y evolución de los síntomas en plantas inoculadas con *M. fijiensis* en casa de cultivo. Se observaron diferencias fenotípicas entre las plantas de ambos genotipos, las cuales en su mayoría coincidieron con las descritas para plantas adultas en condiciones de campo. Adicionalmente, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al grosor y el contenido de lignina de las hojas, mientras que la densidad estomática fue significativamente mayor en las hojas de las plantas del cultivar resistente respecto al susceptible. Finalmente, se demostró, que en el caso de los genotipos de *Musa* 'Grande naine' y 'Calcutta 4', dichas características fenotípicas no parecen ser determinantes en el tipo de respuesta susceptible o resistente que se establece en este patosistema.

Palabras clave: anatomía foliar, bananos, densidad estomática, lignina, Sigatoka negra

### ABSTRACT

Resistance of some varieties of *Musa* sp. to Black Sigatoka is related to the presence of physical barriers associated with leaf anatomy. However, knowledge about the relationship between morphological characters and the type of interaction established in this pathosystem in some *Musa* genotypes is limited. Then, this work is aimed to analyze the relationship between phenotypic characters of 'Grande naine' and 'Calcutta 4' plants cultured *in vitro* and their response to *Mycosphaerella fijiensis* inoculation in greenhouse. Morphological description of 'Calcutta 4' (resistant) and 'Grande naine' (susceptible) plants was carried out under greenhouse conditions. Leaves thickness, stomata density and lignin content were determined on leaves of plants from both genotypes. Phenotypic differences between 'Grande naine' and 'Calcutta 4' plants were observed. These largely coincided with those described for adult plants under field conditions. Additionally, there were not significant differences in thickness and lignin content of leaves. Though, stomata density was significantly higher in leaves of plants from resistant cultivar compared to susceptible genotype. In the case of 'Grande naine' and 'Calcutta 4' *Musa* genotypes, these phenotypic characteristics are not totally determinant in the kind of susceptible or resistant response established in this pathosystem.

Key words: banana, stomata density, foliar anatomy, lignin, black sigatoka

### INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos constituyen la principal fuente de alimentos para millones de personas en el mundo y son además, un renglón fundamental en la economía de muchos países tropicales (Martin *et al.*, 2006). Países de Asia,

India y algunos países latinoamericanos lideran la producción de bananos; solamente en la India se produjeron más de veinte mil millones de toneladas en el año 2007 (FAOSTAT, 2009).

Entre las enfermedades que afectan estos cultivos se encuentra la denominada Sigatoka

negra o Rayado negro de la hoja, la cual es considerada la enfermedad foliar más destructiva y costosa de estos cultivos a nivel mundial (Arzanlou *et al.*, 2008).

Esta enfermedad tiene poco efecto sobre el crecimiento vegetativo de la planta: emergencia de nuevas hojas, altura de la planta; sin embargo, tiene un efecto significativo sobre el rendimiento del cultivo (Valerio *et al.*, 2002).

La Sigatoka puede ser controlada a través del uso de fungicidas, no obstante, debido a su alto costo, a la existencia de cepas resistentes, así como por los daños medioambientales que provoca su utilización, el empleo de genotipos resistentes es el único método de control viable y duradero sin cambiar las técnicas tradicionales de manejos que utilizan los productores (Raut y Ranade, 2004).

Se ha planteado que la resistencia de algunas variedades de *Musa sp.* a la Sigatoka puede estar relacionada con diversos mecanismos que incluyen: los que se desarrollan una vez que el hongo ha penetrado los estomas (mecanismos fitoquímicos relacionados con la acumulación de fenoles y otros compuestos bioquímicos) y los que controlan la entrada del hongo a las hojas mediante barreras físicas, los cuales incluyen rasgos de la anatomía foliar como el espesor y composición de la cutícula y tejidos epidérmicos, la densidad estomática, el contenido de lignina en las hojas, la presencia de apéndices epidérmicos, entre otros (Ferreira *et al.*, 2007).

Sin embargo, aun es limitado el conocimiento de dichas barreras físicas y su influencia en el tipo de interacción compatible o incompatible

que se establece en el patosistema *Musa sp.* - *M. fijiensis* en condiciones de casa de cultivo. Es por esta razón que el objetivo fundamental del presente trabajo fue determinar la relación entre caracteres fenotípicos de plantas de 'Grande naine' y 'Calcutta 4' cultivadas *in vitro* y su respuesta a la inoculación con *Mycosphaerella fijiensis* en casa de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron plantas de 'Grande naine' (*Musa* AAA) y 'Calcutta 4' (*Musa* AA) propagadas *in vitro* vía organogénesis según el protocolo descrito por Orellana (1994).

El material vegetal para el establecimiento *in vitro* de 'Grande naine' provino de la empresa 'La Cuba', Ciego de Ávila y para 'Calcutta 4' del Banco de Germoplasma del INIBAP (ITC 0249, Bélgica).

Las plantas se sembraron en bolsas de polietileno con sustrato compuesto por 50% de casting, 30% de compost y 20% de zeolita y se mantuvieron en fase de aclimatización durante 45 días. Posteriormente, se transfirieron a macetas plásticas de 20 cm de diámetro con un litro de capacidad con igual sustrato por 45 días (en los períodos de febrero-marzo y junio-julio) hasta alcanzar como mínimo 20 cm de altura y tres hojas activas (Figura 1).

Las plantas se colocaron en una casa de cultivo con luz solar, con una media en la intensidad luminosa de 3 841  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}$  (medido con Extech Light Meter 401025, USA) y riego tres veces al día.



Figura 1. Plantas de 'Grande naine' y 'Calcutta 4' procedentes del cultivo *in vitro* y aclimatizadas durante tres meses en casa de cultivo.

## Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los datos de las variables estudiadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 16 para Windows. En cada experimento se detalla el procedimiento utilizado para el análisis de las diferentes variables. En todos los casos se utilizó la posibilidad de generar hasta 10 000 muestras con distribución similar a la real mediante la técnica de Monte Carlo, con una significación del 99% de confianza.

## Caracterización fenotípica

### *Descripción morfológica de las plantas*

Con el fin de describir las plantas según sus características fenotípicas en condiciones de casa de cultivo, se emplearon los siguientes descriptores para plantas de *Musa* sp. adultas en condiciones de campo (IPGRI-INIBAP/ CIRAD, 1996):

- Hábito foliar
- Altura del pseudotallo (cm)
- Color del pseudotallo
- Apariencia del pseudotallo
- Color de la savia
- Canal del peciolo de la hoja 3
- Longitud de la lámina (cm)
- Ancho de la lámina (cm)
- Color de la cara superior de la lámina
- Aspecto de la cara superior de la lámina
- Color de la cara inferior de la lámina
- Aspecto de la cara inferior de la lámina
- Presencia de cera en la lámina
- Forma de la base de la lámina

Se observaron y registraron estas características en 10 plantas de 'Grande naine' e igual número de plantas de 'Calcutta 4' y se organizaron en una tabla resumen.

### *Determinación del grosor de la hoja*

Para comparar el grosor de las hojas de ambos genotipos, se colectó la tercera hoja de diez plantas seleccionadas al azar. Se realizaron cortes transversales a mano, con la ayuda de una cuchilla afilada, a partir de fragmentos foliares de 5 cm<sup>2</sup> de área fijados en alcohol al 70% (v/v), los cuales fueron coloreados con azul de toluidina al 0.5% (v/v) y se colocaron en glicerina acuosa 1:1(v/v). Las observaciones se realizaron en un

microscopio óptico Olympus con un aumento de 200x. Se determinó el grosor de las hojas utilizando un micrómetro ocular. En total se realizaron 50 mediciones en cada genotipo.

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba no paramétrica de Mann-Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

### *Determinación de la densidad estomática*

La densidad estomática fue determinada en la parte abaxial de la hoja, en las tres primeras hojas de diez plantas, de ambos genotipos. Se tomaron tres fragmentos (2 cm<sup>2</sup> de área) de cada sección de la hoja (basal, media y apical), por cada hoja. Posteriormente, se colocaron en un portaobjetos con una gota de agua, se colocó un cubreobjeto y se observó al microscopio óptico Olympus (200x). Se contó el número de estomas en diez campos (0.58 mm<sup>2</sup>) del microscopio óptico, por cada segmento de la hoja analizado, para un total de 90 mediciones en cada genotipo. Los resultados fueron expresados como densidad estomática (número de estomas.mm<sup>-2</sup>).

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

### *Determinación del contenido de lignina*

Para comparar el contenido de lignina constitutiva en las hojas de ambos genotipos, se colectaron las tres primeras hojas de cinco plantas seleccionadas al azar. Se cuantificó el contenido de lignina según el protocolo descrito por Kirk y Obst (1988). Las muestras se procesaron inmediatamente después de colectadas y se homogeneizaron en nitrógeno líquido usando un mortero y pistilo preenfriados. Posteriormente, se extrajeron en metanol y fueron secadas en campana, proceso que se repitió cuatro veces. De cada muestra se tomaron 200 mg y se hidrolizaron en 4 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% (v/v) a 30°C durante 1 h. El hidrolizado fue diluido en 112 ml de agua y mantenido en autoclave a 121°C y 1.2 atm, durante 1 h. La solución fue filtrada utilizando papel de filtro Whatman No. 41 y el residuo sólido fue lavado con abundante agua, posteriormente secado en campana y luego se pesó en balanza

analítica (Sartorius) y se determinó el porcentaje de residuos de la pared celular con respecto a los 200 mg para cada muestra. El contenido de lignina se expresó como porcentaje de residuos de la pared celular.

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba no paramétrica de Mann-Whitney, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

### **Evaluación del desarrollo y evolución de los síntomas**

La preparación de la suspensión micelial de *M. fijiensis* así como el proceso de inoculación artificial se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Alvarado *et al.* (2003). Se empleó la cepa CCIBP-Pf83 de *M. fijiensis* procedente de la Colección de Cultivos Microbianos del Laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba.

Para cada genotipo, se inocularon las tres primeras hojas de 10 plantas con la suspensión micelial del hongo e igual número de plantas con gelatina al 1% (p/v), las cuales se usaron como controles. Las plantas se ubicaron completamente al azar en casa de cultivo.

Las plantas se observaron cada tres días para describir la evolución de los síntomas desde el día tres hasta los 63 días posteriores a la inoculación (dpi). La evaluación cualitativa de los síntomas en las tres hojas inoculadas por planta se realizó según la escala propuesta por Alvarado *et al.* (2003).

Se determinó el período de incubación definido como el número de días desde el momento de la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas (Molina y Castaño, 2003) y el tiempo de evolución de los síntomas definido como la duración en días de la evolución de los síntomas desde el estado 1 al 6 propuestos por Fouré (1985) (Hernández y Pérez, 2001).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Caracterización fenotípica**

#### *Descripción morfológica de las plantas*

Las características fenotípicas de las plantas de ambos genotipos en casa de cultivo

coincidieron en su mayoría con las descritas en el Catálogo de Germoplasma de *Musa* sp. (Daniells *et al.*, 2001), para plantas crecidas en condiciones de campo (Tabla 1).













En cuanto al color del pseudotallo, se observaron diferencias entre ambos genotipos; en el caso de 'Grande naine', esta característica difiere además, de la descrita para las plantas adultas en condiciones de campo. En las plantas analizadas de dicho cultivar, se observó un color verde-rojizo, mientras que en las plantas adultas el pseudotallo es de color verde-amarillo. En las plantas de 'Calcutta 4' el color verde-amarillo del pseudotallo coincide con el descrito para plantas adultas. Sin embargo, para la apariencia del pseudotallo, en las plantas evaluadas de ambos genotipos, las características coincidieron con las descritas para plantas adultas en campo: brillante (no ceroso) y opaco (ceroso) para 'Grande naine' y 'Calcutta 4', respectivamente.

Se observó la presencia de cera en las hojas de las plantas de 'Grande naine' y fue mayor en la parte abaxial de la hoja respecto a la adaxial, mientras que en plantas de 'Calcutta 4', se observó la muy poca cera en las hojas, tanto por la parte adaxial como por la abaxial. Esta característica en las hojas de plantas de *Musa* spp. ha sido descrita por Sandoval (1989) en plantas de tres meses de aclimatización en invernadero. Este autor planteó además, que la cera presente en las plantas crecidas en estas condiciones es mucho menor que la observada en plantas de campo, como consecuencia de la alta humedad relativa y alta temperatura que se genera.

#### *Determinación del grosor de la hoja*

No se encontraron diferencias significativas en el grosor de las hojas entre ambos genotipos a nivel de casa de cultivo; los valores medios obtenidos fueron de 33.11  $\mu\text{m}$  y 32.75  $\mu\text{m}$  en 'Grande naine' y 'Calcutta 4', respectivamente. Las características morfológicas de las hojas, como la composición y distribución de las distintas capas celulares, fueron semejantes en ambos genotipos y coinciden además con las descritas por Sandoval (1989) en plantas de diferentes genotipos de *Musa*, aclimatizadas durante tres meses en invernadero.

Tabla 1. Características morfológicas de plantas de 'Grande naine' y 'Calcutta 4' crecidas durante tres meses en condiciones de casa de cultivo

Descriptores de la planta	'Grande naine'	'Calcutta 4'
	Normal	Decumbente
Hábito foliar		
Altura del pseudotallo (cm)	14.16	14.93
	Verde-rojizo	Verde-amarillo
Color del pseudotallo		
Apariencia del pseudotallo	Brillante (no ceroso)	Opaco (ceroso)
Color de la savia	Lechoso	Lechoso
	Abierto con márgenes alados	Estrecho con márgenes erectos
Canal del peciolo de la hoja 3		
Longitud de la lámina (cm)	22.96	21.25
Ancho de la lámina (cm)	9.78	7.69
	Verde oscuro con rojo violáceo (presencia de machas grandes rojo violáceo)	Verde medio
Color de la cara superior de la lámina		
Aspecto de la cara superior de la lámina	Opaco	Opaco
	Verde plateado	Verde claro
Color de la cara inferior de la lámina		
Aspecto de la cara inferior de la lámina	Opaco	Brillante
Presencia de cera en la lámina	Muy ceroso	Poca cera
	Ambas afiladas	Una redondeada y una afilada
Forma de la base de la lámina		

Se observó, además, la presencia de cutícula en la superficie adaxial de las hojas en ambos genotipos.

Aunque en este trabajo no se observaron diferencias significativas, autores como Valerio *et al.* (2002) encontraron diferencias significativas en el grosor de la hoja de varios genotipos de *Musa* con diferente grado de susceptibilidad a la Sigatoka negra, los mayores valores se observaron en los cultivares resistentes de FHIA y el somaclón 'CIEN BTA-03' y estos fueron bajos en el cultivar 'Yangambí km5', también resistente. Esto evidencia que aunque estos caracteres constituyen barreras mecánicas en los órganos vegetales que dificultan el contacto o entrada de los agentes patógenos, la resistencia a la enfermedad no está ligada directamente a los caracteres anatómicos en algunos cultivares.

#### Determinación de la densidad estomática

Se observó que la densidad estomática entre ambos genotipos fue significativamente diferente; en 'Calcutta 4' (AA) el valor medio fue de 224.54 estomas/mm<sup>2</sup>, mientras que en 'Grande naine' (AAA) fue de 154.80 estomas/mm<sup>2</sup> (Figura 2).

Se ha planteado que estas diferencias en cuanto a la ploidía afectan la expresión

fenotípica de caracteres cuantitativos en plantas de *Musa* spp., según han señalado autores como Vandenhout *et al.* (1995), los cuales plantean que bajos niveles de ploidía están significativamente correlacionados con altas densidades estomáticas.

En ambos genotipos, la densidad estomática fue significativamente mayor en la zona apical respecto a las zonas media y basal de la hoja (Tabla 2). Al respecto, se ha identificado que la densidad de los estomas en hojas de musáceas es mayor en la parte abaxial y en la zona apical de la hoja, sitios donde el tubo germinativo del hongo tiene una mayor probabilidad de penetrar (Sandoval y Muller, 1999).

Estos resultados coinciden con los informados por Valerio *et al.* (2002), los cuales observaron una mayor densidad estomática en el cultivar resistente 'Yangambí km5', que en otros híbridos de mayor ploidía analizados. Sin embargo, autores como Hernández *et al.* (2006) observaron que los cultivares de plátano 'FHIA 20', 'FHIA 21' y topocho 'Pelipita', caracterizados como resistentes a la Sigatoka negra, presentaron una densidad estomática mucho menor respecto a la de los clones de plátano 'Hartón' y 'África' clasificados como susceptibles a la enfermedad.

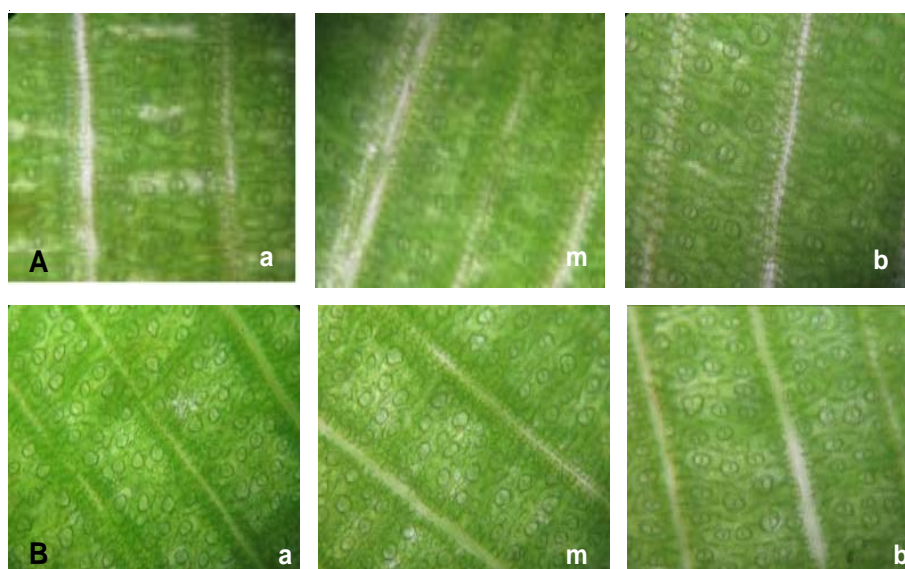


Figura 2. Densidad estomática en la zona abaxial de hojas de A) 'Grande naine' (baja densidad estomática) y B) 'Calcutta 4' (alta densidad estomática), a: zona apical, m: zona media y b: zona basal de la hoja (200x)

Tabla 2. Densidad estomática (No. de estomas/mm<sup>2</sup>) en las distintas zonas de la hoja de plantas de 'Grande naine' y 'Calcutta 4'

Zona	'Grande naine'		'Calcutta 4'	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
Apical	235.31	202.30 a	163.16	177.85 a
Media	231.19	143.59 b	155.33	166.59 b
Basal	207.51	65.12 c	145.71	66.56 c

Rangos medios con letras diferentes en una misma columna difieren por Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para  $p < 0.01$

Se ha planteado, que la densidad estomática es uno de los mecanismos de resistencia estructural que actúan como barreras físicas que impiden la penetración del patógeno en la planta. Además, el número de estomas puede indicar la eficiencia de determinada especie vegetal en el proceso de respiración y fotosíntesis, que contribuyen, entre otras funciones, en la formación de sustancias químicas capaces de frenar el avance del patógeno en la hoja (Beveraggi *et al.*, 1995). No obstante, algunos estudios realizados en evaluaciones sobre las características morfológicas y fisiológicas de los estomas en hojas de plantas de *Musa sp.*, mostraron que la resistencia a la Sigatoka negra, no está determinada por este elemento morfológico (Vuylsteke *et al.*, 1998).

#### Determinación del contenido de lignina

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al contenido de lignina en las hojas de las plantas de 'Grande naine' y 'Calcutta 4' analizadas; la media de los valores obtenidos fue de 14.06 y 13.78 (% de residuos de la pared celular), respectivamente.

Aunque en la interacción *Musa-M. fijiensis* la entrada del patógeno es a través de los estomas en otros patosistemas, el contenido de lignina se ha relacionado con el mecanismo de defensa de la planta, ante la penetración del patógeno. En este sentido, se ha demostrado que en plantas de *Oryza sativa* infectadas con *Pyricularia grisea* esta ocurre principalmente a través de la lignina de la pared celular (Schaffrath *et al.*, 1996).

Se conoce además, que debido a la compleja naturaleza de los polímeros de lignina, es difícil

su degradación, por lo cual este constituye uno de los prerrequisitos para la patogénesis en la interacción planta-patógeno (Valette *et al.*, 1998).

#### Evaluación del desarrollo y evolución de los síntomas

El período de incubación en plantas infectadas de 'Grande naine' fue de 14 días, mientras que en plantas infectadas de 'Calcutta 4' fue de seis días aproximadamente (Figura 3, Ay B). En plantas inoculadas del cultivar susceptible 'Grande naine' se observó la evolución completa de los síntomas desde el estado 1 hasta el 5. El tiempo de evolución de estos fue de 52 días, lo que coincide con los resultados descritos por Alvarado *et al.* (2003) y Leiva (2008) en dicho cultivar, bajo condiciones experimentales similares.

En el genotipo resistente 'Calcutta 4' se observaron síntomas que solo evolucionaron hasta el estado 3 de la enfermedad, resultados similares fueron descritos por Leiva (2008) en el genotipo resistente 'Yangambí km5' en condiciones similares.

En las plantas inoculadas de 'Grande naine', se observó la presencia de lesiones puntiformes de color pardo-rojizo por la parte abaxial de las hojas alrededor de los 14 dpi (Figuras 3A y 4Aa). Dichas lesiones evolucionaron hacia la formación de manchas de contornos irregulares de coloración pardo-rojizas alrededor de los 21 dpi (Figuras 3A y 4Ab), los cuales fueron visibles por la parte adaxial de las hojas (Figuras 3A y 4Ac) a los 30 dpi aproximadamente. A partir de los 38 dpi se observaron manchas negras con bordes cloróticos y halos acuosos (Figuras 3A y 4Ad). Posteriormente, al cabo de los 52 dpi, se

observó la presencia de manchas grises circulares o elípticas con centros secos (Figuras 3A y 4Ae), las cuales en su mayoría, se unieron y formaron manchas necróticas. La evolución de los síntomas en el genotipo 'Grande naine' así como sus características coincidieron con lo descrito por Leiva (2008) en dicho cultivar bajo condiciones similares.

En las plantas inoculadas de 'Grande naine', se observó la presencia de lesiones puntiformes de color pardo-rojizo por la parte abaxial de las hojas alrededor de los 14 dpi (Figuras 3A y 4Aa). Dichas lesiones evolucionaron hacia la formación de manchas de contornos irregulares de coloración pardo-rojizas alrededor de los 21 dpi (Figuras 3A y 4Ab), los cuales fueron visibles por la parte adaxial de las hojas (Figuras 3A y 4Ac) a los 30 dpi aproximadamente. A partir de los 38 dpi se observaron manchas negras con bordes

cloróticos y halos acuosos (Figuras 3A y 4Ad). Posteriormente, al cabo de los 52 dpi, se observó la presencia de manchas grises circulares o elípticas con centros secos (Figuras 3A y 4Ae), las cuales en su mayoría, se unieron y formaron manchas necróticas. La evolución de los síntomas en el genotipo 'Grande naine' así como sus características coincidieron con lo descrito por Leiva (2008) en dicho cultivar bajo condiciones similares.

En plantas inoculadas de 'Calcutta 4' los primeros síntomas se observaron a los 6 dpi (Figuras 3A y 4Ba) y estos presentaron las mismas características observadas en las plantas inoculadas de 'Grande naine', igualmente ocurrió con los síntomas en estado 2, los cuales se observaron alrededor de los 14 dpi (Figuras 3A y 4B b) y con los síntomas en estado 3, los cuales se observaron a los 21 dpi (Figuras 3A y 4B c).

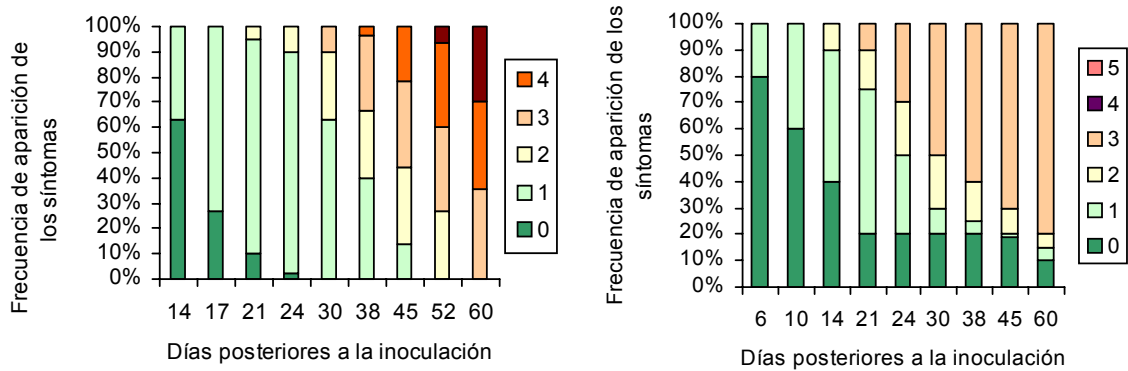


Figura 3. Evolución de los síntomas en plantas de A) 'Grande naine' y B) 'Calcutta 4' inoculadas con *M. fijiensis*, en casa de cultivo

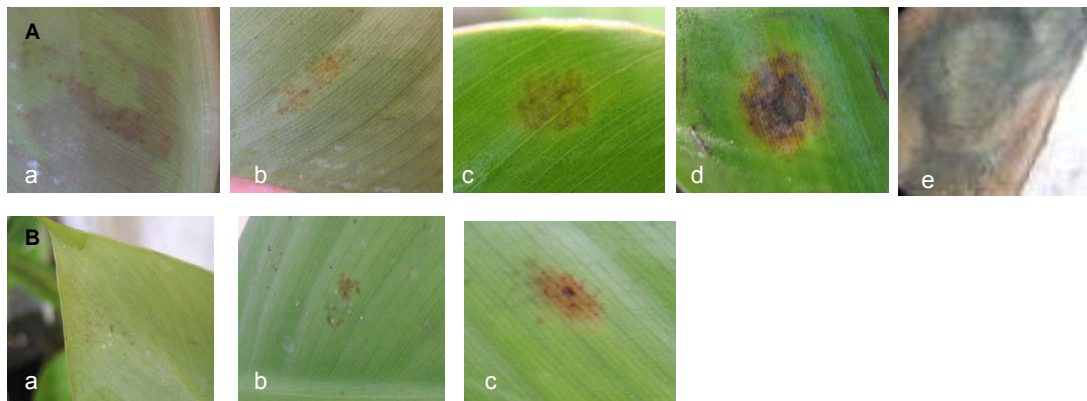


Figura 4. Síntomas en hojas de plantas de A) 'Grande naine' y B) 'Calcutta 4' en diferentes estados, causados por la inoculación artificial de *M. fijiensis*, en casa de cultivo. (a) Lesiones puntiformes rojizas (estado 1), (b) manchas con contornos irregulares de coloración pardo-rojiza por la parte abaxial de la hoja (estado 2), (c) manchas con contornos irregulares de coloración pardo-rojiza por la parte adaxial de la hoja (estado 3) y (d) mancha negra con borde clorótico y halo acuoso (estado 4) y (e) mancha negra con centro gris seco (estado 5)



Aunque se ha planteado que la resistencia de algunas variedades de *Musa* sp. a la Sigatoka negra está relacionada directamente a la presencia de barreras físicas asociadas a la anatomía foliar (Valerio *et al.*, 2002), en el caso de los genotipos 'Grande naine' y 'Calcutta 4', características morfológicas como el grosor de la hoja, la densidad estomática y el contenido de lignina constitutiva en las hojas, no parecen ser determinantes en el tipo de respuesta susceptible o resistente que se establece en este patosistema en plantas inoculadas en casa de cultivo.

## CONCLUSIONES

Se demostró que no existe relación entre los caracteres fenotípicos y la respuesta a la inoculación con *M. fijiensis* en plantas de 'Grande naine' y 'Calcutta 4' y que el fenotipo de resistencia que se observa en 'Calcutta 4' no puede atribuirse a sus rasgos anatómicos sino, probablemente, a factores o mecanismos de tipo bioquímico. Además, se corroboró la relación existente entre el nivel de ploidía y la densidad estomática de los genotipos de banano.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló en el marco del Programa Institucional de Cooperación entre la Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas y el Consorcio de Universidades Flamencas de Bélgica (IUC UCLV/VLIR).

## REFERENCIAS

- Alvarado, Y, Leiva M, Rodríguez MA, Acosta M, Cruz M, Portal O, Kosky RG, García L, Bermúdez I, Padrón J (2003) Early evaluation of Black leaf streak resistance by using mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. En: (Jacome L, Leproive P, Martin D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (eds)) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook, pp. 169-175. INIBAP, Montpellier
- Arzanlou, M, Groenewald JZ, Fullerton RA, Abeln ECA, Carlier J, Zapater MF, Buddenhagen IW, Viljoen A, Crous PW (2008) Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs of banana. *Persoonia* 20:19-37
- Beveraggi, A, Zapater MF, Mourichon X (1995) Análisis de la resistencia de los bananos a la Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* (*Cercospora fijiensis*). En: Referencias bibliográficas *Musa*. 1999, sobre bananos y plátanos. Memorias XIII Reunión ACORBAT, Guayaquil, Ecuador. 1998. pp 6-11. CIRAD-CA. Montpellier, Francia
- Daniells, J, Jenny C, Karamura D, Tomekpe K (2001) Musalogue: A catalogue of *Musa* Germplasm. Diversity in the genus *Musa* (Arnaud, E y Sharrock S, compil.). International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France
- FAOSTAT (2009). Food and agriculture organization of the United Nations. [En línea] En: <http://faostat.fao.org>. Consultado el: 10 de Diciembre de 2009
- Ferreira, RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista LM, Duarte J, Borges A, Teixeira AR (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 5: 677-700
- Fouré, E (1985) Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon. *Fruits* 40: 393-399
- Hernández, A, Pérez L (2001) Reaction of Banana and plantains cultivars to Black Sigatoka disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Epidemiological components of the resistance. *Fitosanidad* 5(3): 9-19
- IPGRI-INIBAP/CIRAD (1996) Descriptores para el banano (*Musa* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia; y el Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Montpellier, Francia
- Kirk, TK, Obst JR (1988) Lignin determination. *Methods Enzymol* 161: 87-101
- Leiva, M (2008) Evaluación temprana *Musa* spp. a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. En casa de cultivo. Tesis para aspirar por el grado científico de doctor en ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, Cuba. 100 p
- Martin, KP, Zhang C, Slater A, Madassery J (2006) Control of shoot necrosis and plant death during micro-propagation of banana and plantains (*Musa* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88: 51-59
- Orellana, P (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis para aspirar por el grado científico de doctor en ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, Cuba. 120 p.
- Raut, SP y Ranade S (2004) Diseases of Banana and their Management. En: Naqui, SAMH (ed)

- Diseases of Fruits and Vegetables, pp. 37-52. Volume II. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Sandoval, J, Müller, L (1999). Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa AAA*). CORBANA 24(51): 43-60
- Sandoval, JA (1989) Estudio de la anatomía y morfología vegetativas de plantas de *Musa in vitro*, en condiciones de aclimatación y en el campo. Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. Turrialba, Costa Rica
- Schaffrath, U, Thieron M, Scheinpug H, Reisener HJ (1996) Biochemical and cytological aspects of genetical and acquired resistance in the rice blast interaction. Cahiers Options Mediterraneennes. 15:125-130
- Valerio, R, Lindorf H, de García E (2002) Relación entre la anatomía foliar de variedades de *Musa* sp. y su comportamiento frente a la Sigatoka (amarilla y negra). En: Acorbat, Memorias XV Reunión. Realizada en Cartagena de Indias, Colombia. 27 de octubre al 02 noviembre de 2002. Medellín (COL): Asociación de Bananeros de Colombia, AUGURA 2002
- Valette, C, Andary C, Geiger JP, Sarah JL, Nicole M (1998) Histochemical and Cytochemical Investigations of Phenols in Roots of Banana Infected by the Burrowing Nematode *Radopholus similis*. Nematology 88(11): 75-81
- Vandenhout, H, Ortiz D, Vuylsteke R, Swennem R, Bai KV (1995) Effect of Ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. Euphytica 83: 117-122
- Vuylsteke, DR, Ekanayake I, Ortiz R (1998) Conductancia estomática de las hojas y morfología de los estomas del material genético de *Musa*. Euphytica 99(3): 211-229