

Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia

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

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830 e-mail: michel@ibp.co.cu

RESUMEN

El empleo de métodos de evaluación de la respuesta de plantas de *Musa* a la infección natural con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en campo han permitido la diferenciación de genotipos susceptibles, parcialmente resistentes y resistentes a la Sigatoka negra. Sin embargo, no existen métodos de inoculación artificial reproducibles ni se ha logrado caracterizar el ciclo infectivo de *M. fijiensis* combinado con el uso de variables epifitológicas y componentes de la resistencia para diferenciar genotipos de *Musa* spp. en casa de cultivo. En el presente trabajo se presenta un protocolo para solucionar dicho problema. En él se describen aspectos relacionados con los caracteres culturales, morfológicos, moleculares y agresividad de aislados de *M. fijiensis*, así como el uso de una escala evaluativa descriptiva. Asimismo, permite la utilización de variables epifitológicas y componentes de la resistencia para caracterizar el ciclo infectivo de *M. fijiensis* en casa de cultivo y diferenciar la respuesta de genotipos susceptibles y resistentes. Con este protocolo se logra reducir el tiempo requerido para evaluar la resistencia de *Musa* spp. a *M. fijiensis* y por ende se pueden realizar un mayor número de evaluaciones. Además, proporciona una herramienta que permite abordar estudios relacionados con la interacción *Musa-M. fijiensis*, facilita la validación de predicciones bioinformáticas, abre un camino en la búsqueda de nuevos candidatos de fungicidas y en el control biológico de la Sigatoka negra.

Palabras clave: ascomicetes, ciclo infectivo, mejoramiento genético

ABSTRACT

The use of assessment methods of *Musa* response to natural infection with *M. fijiensis* in field has allowed differentiation of susceptible, partially resistant and resistant genotypes to black Sigatoka. However, artificial inoculation methods are not reproducible. Neither, characterization of the infective cycle of *M. fijiensis* combined with the use of epidemiological variables and components of resistance to differentiate genotypes of *Musa* spp has been achieved. A protocol to solve this problem is presented in this paper. It describes aspects related to cultural characteristics, morphological, molecular and aggressiveness of isolates of *M. fijiensis*, and the use of descriptive evaluation scale. It also allows the use of epidemiological variables and components of resistance to characterize the infective cycle of *M. fijiensis* in greenhouse and differentiate the response of susceptible and resistant genotypes. This protocol is able to reduce the time required to evaluate the resistance of *Musa* spp against *M. fijiensis* and therefore to make a greater number of evaluations. It also provides a tool for supporting related studies on *Musa-M. fijiensis* interaction, facilitates the validation of bioinformatic predictions, opens a path in search of new candidates of fungicides and biological control of black Sigatoka.

Key words: ascomycetes, genetic improvement, infective cycle

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las variedades de plátanos y bananos son partenocárpicas y no producen semillas por lo cual son cultivos difíciles de mejorar genéticamente (Robinson, 1996). A pesar de esto, los programas de mejoramiento genético han obtenido progresos y como

resultado se han obtenido nuevos clones híbridos, que han estado disponibles para su evaluación en diferentes sitios.

La raya negra de la hoja o Sigatoka Negra, es la enfermedad más importante que ataca la superficie foliar de *Musa* spp. (Mourichon *et al.*, 2000). Produce grandes pérdidas del área

fotosintética tanto por la acción del patógeno como de sus toxinas difundidas (El-Hadrami *et al.*, 2005). Esta enfermedad está considerada como la más perjudicial para este cultivo a nivel mundial (Pasberg-Gaul *et al.*, 2000).

El agente causal de la Sigatoka negra es el hongo ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, descrito por vez primera por Leach (1964). El ciclo de vida de este patógeno está caracterizado por dos estados: uno sexual (teleomorfo) y otro asexual (anamorfo) (Meredith y Lawrence, 1969).

Para complementar los programas de mejoramiento genético de *Musa* es recomendable disponer de metodologías de evaluación y selección de genotipos resistentes frente a *M. fijiensis* que sean eficientes y reproducibles (Bakry *et al.*, 2009).

La evaluación en campo bajo condiciones naturales de infección, ha sido durante mucho tiempo el único método disponible para evaluar y seleccionar genotipos de *Musa* resistentes a *M. fijiensis* (Orjeda, 2000). Dichas evaluaciones deben estar validadas por la comparación de los genotipos de interés con cultivares de referencia en pruebas multilocales (Mourichon, 1995; Carlier *et al.*, 2003) por lo que la evaluación en campo es inconveniente y costosa para una prueba rápida en la identificación de genotipos de *Musa* resistentes a *M. fijiensis*.

Sin embargo, en campo se han observado diferencias en la respuesta de los genotipos a *M. fijiensis* con la utilización de plantas cultivadas *in vitro*, pero estos ensayos no se realizaron con una presión de inóculo uniforme por lo que sus resultados no pudieron ser comparados con los obtenidos en otras localidades (Mobambo *et al.*, 1994). Esto indica la necesidad de establecer métodos repetibles y reproducibles de evaluación temprana de la resistencia.

Asimismo, se han desarrollado métodos de evaluación temprana de la resistencia a *M. fijiensis* tales como: inoculación artificial en invernadero (Mourichon *et al.*, 1987), inoculación de fragmentos de hojas de plantas adultas (Abadie *et al.* 1999; El-Harami *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2006; Twizeyimana *et al.*, 2007), la utilización de toxinas en hojas y suspensiones de cloroplastos (Harelimana *et al.*, 1997; Lepoivre *et al.*, 2003; Bussogoro *et al.*, 2004) y la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. cultivadas *in vitro* de plantas en fase de multiplicación dentro de tubos de ensayo (Twizeyimana *et al.*, 2007). Sin embargo, en el primero solamente se describe el desarrollo de síntomas; en el segundo el hongo no logra completar su ciclo de vida debido a la senescencia temprana de los fragmentos de hojas y la presencia de contaminantes bacterianos y fúngicos que interfieren con la evaluación; en el tercero existen varias toxinas de *M. fijiensis* y ninguna de ellas son determinantes primarios de la patogenicidad y el último carece de repetibilidad y reproducibilidad.

De igual modo, se requieren variables epifitológicas que puedan caracterizar el ciclo infectivo de este patógeno en casa de cultivo para su posible utilización en la selección de genotipos resistentes a la Sigatoka negra, las cuales no han sido utilizadas en su mayoría. Esta problemática ha impedido un mayor avance en los programas de mejoramiento genético de *Musa* frente a este importante patógeno.

Tomando en consideración lo anteriormente mencionado, el presente trabajo tuvo como objetivo de presentar un protocolo para la diferenciación de genotipos de *Musa* spp. mediante la reproducción del ciclo infectivo de *M. fijiensis* y el uso de variables epifitológicas y componentes de la resistencia.

Para la confección del presente protocolo se tomaron en consideración varias investigaciones científicas informadas en publicaciones previas (Leiva-Mora *et al.*, 2002; Alvarado-Capó *et al.* 2003; García *et al.*, 2003; Acosta-Suárez *et al.*, 2004; Cruz-Martín *et al.*, 2004; Leiva-Mora *et al.*, 2006; Bermúdez-Carabaloso *et al.*, 2007) y tesis (Leiva-Mora, 1998; Cruz-Martín, 2002; Acosta-Suárez, 2004; Leiva-Mora, 2008) relacionadas con la evaluación temprana de la resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plátanos y bananos.

MATERIALES

Materiales biológicos

Cepas de M. fijiensis

Se utilizarán cepas de *M. fijiensis* previamente caracterizadas en base a su patogenicidad y

agresividad así como respecto a sus caracteres culturales y morfológicos (Cruz-Martín *et al.*, 2004). Se recomienda utilizar aquellas que mayor agresividad hayan mostrado en los ensayos de caracterización patogénica y que no tengan más de cuatro subcultivos.

Plantas de Musa spp.

Se emplearán genotipos de *Musa spp.* según el interés del evaluador.

Se sugiere incluir a: 'Grande naine' (*Musa AAA*) (control susceptible), 'Calcutta 4' (*Musa AA*) (control resistente) y 'FHIA-18' (*Musa AAAB*) o 'FHIA-25' (*Musa AAA*) (controles de resistencia parcial). Los genotipos sugeridos servirán como referencia para la clasificación del fenotipo de la resistencia.

Materiales y equipos

1. Agua desionizada estéril
2. Asa de inoculación para hongos
3. Agitador orbital (Gerhardt)
4. Bandejas plásticas
5. Batidora (Waring)
6. Bolsas de polietileno
7. Cabina de flujo laminar
8. Cámara de Neubauer (hematocímetro)
9. Cesto o bandeja para recoger residuos
10. Contador de colonias
11. Cuaderno de trabajo
12. Erlenmeyers 500
13. Espátula de Drigalski
14. Guantes
15. Higrotermógrafo
16. Homogenizador (Ultra-turrax T25)
17. Horador (sacabocado)
18. Incubadoras (25-28°C)
19. Marcadores permanentes
20. Mechero
21. Micropipetas de 5 000, 1 000 y 200 μ l
22. Microscopio óptico
23. Papel de filtro (Whatman N° 4)
24. Pinceles
25. Placas de Petri (7 cm de diámetro)
26. Portaobjetos y cubreobjetos
27. Puntas estériles para Micropipetas de 5 000, 1 000 y 200 μ l
28. Tamiz de 40 μ m
29. Tijeras
30. Tapa boca
31. Vasos de precipitado de 1 000 ml estériles

32. Luxómetro (Extech Light Meter 401025)
33. Bandejas de polieturano (70 alveólos)
34. Recipientes de cultivo de 500 ml de capacidad

Medios de cultivo y soluciones

- Agar papa dextrosa (PDA, Difco) (bacto dextrosa 20g, bacto agar 15g, H₂O 1 000 ml, pH = 5.6). Se usará para el aislamiento, caracterización cultural y morfológica de los aislados de *M. fijiensis*, así como para el subcultivo y mantenimiento de las cepas.
- Alcohol (70%) (v/v) para la desinfección del instrumental y el puesto de trabajo en la preparación del inóculo así como para la desinfección de los utensilios empleados para la inoculación artificial.
- Bálsamo de Canadá (Fluka)
- Caldo papa dextrosa (PDB, Duchefa) (Extracto de papa 4g, dextrosa 20g, H₂O 1 000 ml, pH = 5.6). Este medio de cultivo será utilizado para la producción de micelio.
- Gelatina al 1%
- KOH 10% (m/v)
- Lactofenol (fenol 20 g; ácido láctico 20 g; glicerol 40 g; agua 20 ml).

PRECAUCIONES Y MEDIDAS DE SEGURIDAD

A pesar que *Mycosphaerella fijiensis* es un hongo fitopatógeno y no se considera potencialmente patógeno para la salud humana y que las estructuras infectivas producidas *in vitro* (micelio o conidios) son las más comúnmente utilizadas en la inoculación artificial, se recomienda utilizar guantes, batas sanitarias, tapaboca y todos los medios de protección necesarios para prevención de riesgos a la salud de los técnicos e investigadores que participen en los ensayos de inoculación.

PROCEDIMIENTO

I. Preparación del material vegetal

1. Propagar plantas de *Musa spp.* por organogénesis (Orellana, 1994) o embriogénesis somática (Kosky *et al.*, 2001).
2. Aclimatizar en casa de cultivo como sigue: los primeros 30 días se

mantendrán en bandejas de polieturano (70 alvéolos) con sustrato compuesto por 50% de humus de lombriz, 30% de compost y 20% de zeolita a una razón de 5:3:2 (v/v).

Nota: La intensidad luminosa se regulará mediante una malla sombreadora plástica de color negro, que permitirá el paso del 70.0% de la luz solar (aproximadamente $3\ 361\ \mu\text{mol m}^2\ \text{s}^{-1}$).

3. Transferir a recipientes de 500 ml de capacidad y mantener hasta alcanzar como mínimo 20 cm de altura y al menos tres hojas activas (Figura 1).
4. Colocar las plantas en un cuarto de inoculación al menos una semana antes de inocular.
5. Realizar previo a la inoculación una poda de saneamiento para eliminar cualquier parte del material vegetal que haya sufrido daños mecánicos o porciones de tejido afectadas por algún patógeno o plaga que pueda enmascarar los resultados del experimento.

Nota: En el cuarto de inoculación es importante una adecuada iluminación (debe ser aproximadamente igual $3841\ \mu\text{mol m}^2\ \text{s}^{-1}$) y que esta se distribuya de manera uniforme ya que muchas de las toxinas de *M. fijiensis* requieren de la luz para lograr su actividad fitotóxica (Daub y Ehrenshaft, 2000).

Nota: La distancia entre plantas debe estar acorde con su hábito de crecimiento para evitar solapamiento de hojas de plantas diferentes. El local de inoculación debe estar limpio.

II. Preparación del inóculo

1. Tomar un fragmento de micelio del aislado seleccionado (procedente de tubos de ensayo con medio de cultivo PDA y conservado a 4°C) e inocularlo en placas de Petri con medio de cultivo PDA. Incubar durante 14 días.
2. Inocular Erlenmeyers (250 ml de capacidad) que contengan 100 ml del medio de cultivo PDB con 5 ml de una suspensión micelial con una concentración en orden de 10^5 fragmentos de micelio ml^{-1} .

Nota: Para comprobar la calidad del inóculo preparado, se sugiere diseminar 50 μl de la suspensión micelial de *M. fijiensis*, en placas de Petri que contengan medio de cultivo Agar nutriente e incubar a 30°C durante 24 h. Esto permite comprobar que no contiene contaminantes bacterianos.

3. Incubar los Erlenmeyers inoculados en un agitador orbital (Gerhardt) a 26°C y 120 rpm durante 14 días.
4. Eliminar el medio de cultivo por decantación y coleccionar el micelio.
5. Tomar 1 g de micelio y homogenizarlo en un tubo de ensayo (FALCON® de 50 ml de capacidad) con 30 ml de agua desionizada estéril en un homogenizador (Ultra-turrax T25) durante 1 minuto (Figura 1).
6. Filtrar el homogenizado micelial a través de un tamiz (40 μm).
7. Determinar la concentración de fragmentos de micelio ml^{-1} mediante conteo en cámara de Neubauer en un microscopio óptico (aumento 100x).
8. Ajustar con agua destilada estéril la concentración de fragmentos de micelio a un valor aproximado de 10^5 fragmentos de micelio ml^{-1} .
9. Añadir gelatina para una concentración final del 1% (m/v).

III. Inoculación y evaluación

1. Aplicar el homogenizado micelial con un pincel sobre el envés de las tres hojas más jóvenes totalmente extendidas (Figura 1).
2. Dejar secar las hojas inoculadas durante dos horas y luego mantener la humedad relativa entre el 90-100% (mediante aspersión o nebulización) durante los tres primeros días y después se mantendrá por encima del 70%.
3. Incluir como controles: plantas inoculadas con agua desionizada estéril (controles de inoculación), plantas inoculadas con gelatina al 1% (control de posible fitotoxicidad del adherente foliar), así como plantas sin inocular (controles absolutos).
4. Revisar diariamente las plantas hasta que aparezcan macroscópicamente

los primeros síntomas por el envés (aproximadamente a partir de los 10-14 días).

Nota: Se podrán evaluar diferentes tipos de variables de acuerdo con el interés del investigador. A continuación se recomiendan algunas variables útiles en la evaluación de la respuesta de genotipos de *Musa* spp. a la inoculación artificial de *M. fijiensis*.

Variables epifitológicas

Período de incubación: Periodo que media desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas. Se evaluará a partir de los 10 hasta los 21 días posteriores a la inoculación (dpi) artificial.

Tiempo de evolución de los síntomas: Definido como el tiempo (días) desde que aparecen los primeros síntomas hasta la aparición de manchas grises con centro seco.

Tiempo de desarrollo de la enfermedad: Definido como el tiempo que media desde la inoculación hasta que aparecen manchas grises con centro seco.

Índice de infección: Definido como el porcentaje del área de las hojas con lesiones necróticas mediante la estimación usando la escala diagramática desarrollada por Stover (1971) y modificada por Gauhl (1994) para evaluar la resistencia de *Musa* spp. a las especies de *Mycosphaerella* que causan el manchado de las hojas (Carlier *et al.*, 2002), en la cual: 0= no presencia de síntomas; 1= Estadios 1, 2, 3, pero no más de 10 síntomas con estadio 4; 2= más de 10 síntomas con estadio 4 pero menos del 5% del área de las hojas afectadas; 3= 6 al 15% del área de las hojas afectadas; 4= 16 al 33% del área de las hojas afectadas; 5= 34 al 50% del área de las hojas afectadas; 6 = más del 50% del área de las hojas afectadas. La evaluación se realizará a los 63 dpi

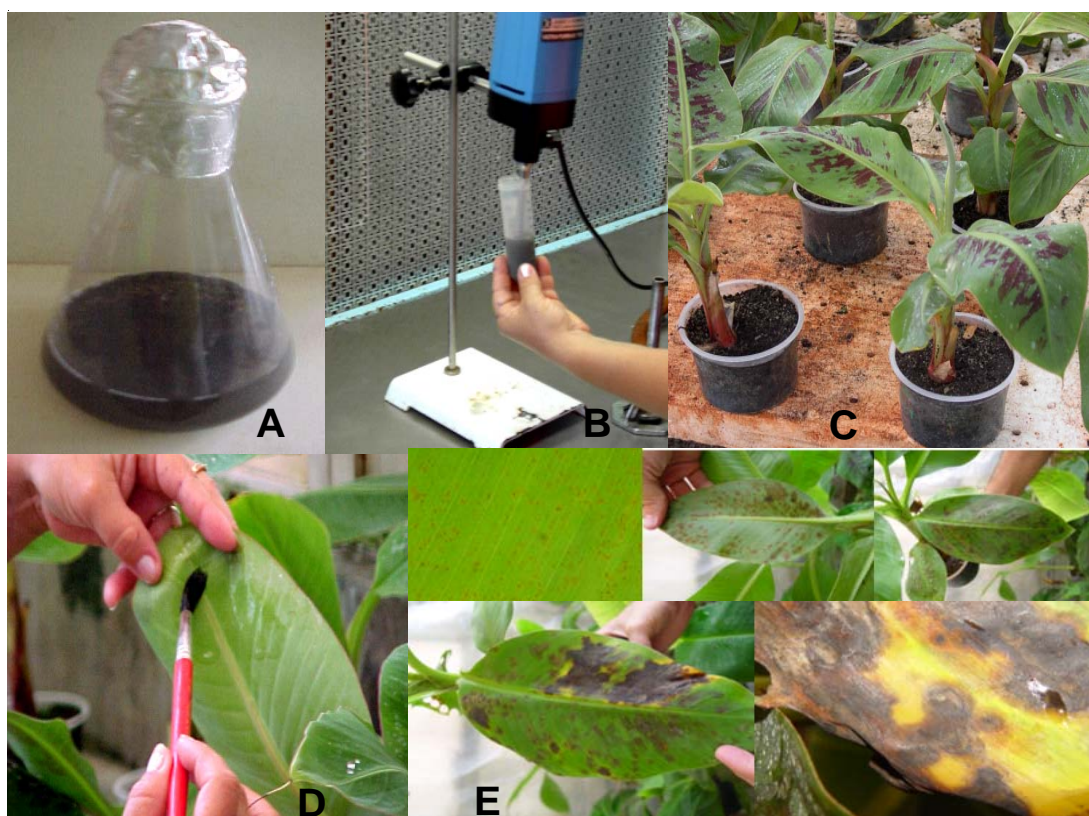


Figura 1. Inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* en casa de cultivo. A. Cultivo de *M. fijiensis* en PDB, B. preparación de la suspensión de micelio, C. plantas de *Musa* spp. obtenidas por cultivo *in vitro* y aclimatizadas, D. Inoculación artificial con pincel por el envés de las hojas, E. Síntomas en hojas inoculadas.

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE): Esta variable se calculará acorde con la fórmula propuesta por Shaner y Finney (1977):

$$\sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i) / 2] [X_{i+1} - X_i]$$

donde Y_i = expresa la severidad (en función del índice de infección acorde con la escala), X_i = tiempo (días) a la i -ésima observación y n = número total de observaciones.

La severidad se calculará según la fórmula

$$II = \frac{nb}{(N-1)T}$$

donde n = número de hojas en cada nivel de la escala; b = valor de la escala correspondiente, $N = 7$ y T = número total de hojas evaluadas por plantas, y se utilizará la escala evaluativa que aparece en la figura 2.

Componentes de la resistencia

Número y área de las lesiones necróticas: Estas variables se sugiere evaluarlas entre los 45-63 dpi en las hojas inoculadas que tengan manchas necróticas. Se cuentan y miden todas las manchas necróticas individuales en estadio 4 y 5 (Figura 2), provenientes de la parte media de las hojas y se descartan aquellas que se ubicaban en los bordes y en el tercio basal y apical de las hojas. El área de las lesiones necróticas, se calculará mediante la fórmula de la elipse $A = 3.14 \times a \times b$, donde a y b son los radios mayores y menores de las manchas elípticas o redondeadas observadas el genotipo que se evalúe.

Período de generación de las estructuras asexuales. Tiempo que media entre la fecha de la inoculación y la producción de los primeros conidios en las hojas enfermas (días). Sugerimos comenzar a evaluar dicha variable a partir del estadio 3 y 4 (Figura 2). Observar el envés de las hojas preferiblemente.



Figura 2. Escala descriptiva para la evaluación del desarrollo de los síntomas en hojas de *Musa* spp. inoculadas con *M. fijiensis* Morelet (Alvarado-Capó *et al.*, 2003).

Número de conidios, espermogonios y pseudotecios: Para evaluar estas variables se tomarán discos de hojas (1 cm de diámetro) mediante un horador que contengan manchas correspondientes a los estadios 4 y 5 (Figura 2) y se decolorarán en una solución de KOH 10% (m/v) durante 24h. Posteriormente los discos serán lavados en agua desionizada estéril durante una hora tres veces consecutivas, para luego colocarlos en portaobjetos con lactofenol. Finalmente, se le colocan cubreobjetos y las muestras pueden ser selladas con bálsamo de Canadá. Las observaciones pueden realizarse microscopio óptico con un aumento de 200x. Para la diferenciación de los espermogonios y pseudotecios se sugiere observar la figura 3.

CULMINACIÓN DEL ENSAYO

Una vez concluida la última evaluación se procederá a desmontar el experimento. El material vegetal inoculado será extraído de las macetas o bolsas y todos los restos vegetales se colocarán en bolsas de polietileno para evitar la diseminación del patógeno. Las bolsas finalmente serán incineradas.

CONSIDERACIONES FINALES

El presente protocolo, ha logrado estandarizar la producción de inóculo de *M. fijiensis* para la diferenciación temprana de genotipos de *Musa* de respuesta conocida en campo. Asimismo, ha permitido seleccionar aislados de *M. fijiensis* según su agresividad en los ensayos de inoculación.

Este protocolo garantiza un desarrollo homogéneo de los síntomas en las plantas inoculadas y la utilización de una escala de evaluación descriptiva que junto a variables epifitológicas y componentes de la resistencia permiten evaluar tempranamente la respuesta de genotipos de *Musa* frente a *M. fijiensis*.

Colateralmente, este protocolo utiliza plantas procedentes del cultivo de tejidos, con lo cual se incrementa la homogeneidad en su altura, edad, número de hojas activas, condiciones de aclimatización, nutrición y su estado fitosanitario sin la presencia de otros patógenos foliares.

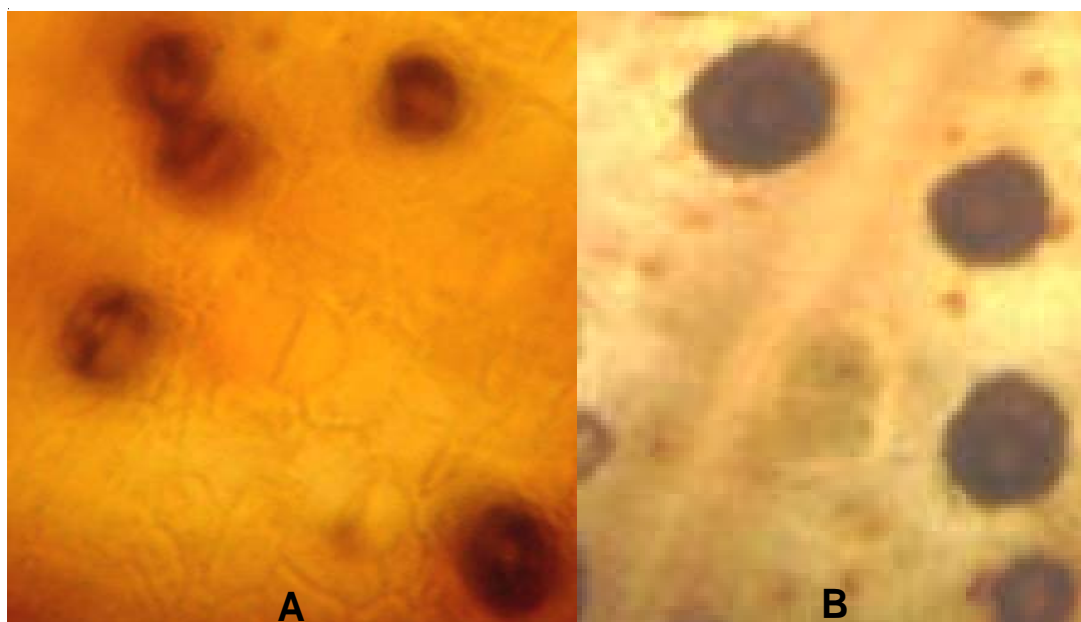


Figura 3. Morfología de espermogonios (a) y pseudotecios (b) de *M. fijiensis* observados a partir de lesiones necróticas correspondientes al estadio 5 (tabla 1) en el cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA).

Nota: para observar la presencia de pseudotecios en las plantas inoculadas artificialmente se deben inocular al menos dos cepas de *M. fijiensis* que pertenezcan a diferentes grupos de apareamiento sexual.

Con este trabajo, se demuestra que con suspensiones miceliales se puede reproducir la sintomatología de la Sigatoka negra y diferenciar la respuesta de genotipos de *Musa* en casa de cultivo. Este método en comparación con las evaluaciones de campo, posibilita determinar la respuesta de los genotipos de *Musa* independientemente de las condiciones ambientales que existan. En la literatura científica especializada sobre *M. fijiensis*, no se encuentran estudios que combinen la caracterización cultural, morfológica, molecular, patogénica y de agresividad de conjunto; para realizar un análisis global de la variabilidad entre aislados de esta especie.

La introducción del presente protocolo ha sido acreditada en la evaluación de la respuesta de mutantes de dos cultivares de *Musa* spp. ('Grande naine' y 'FHIA-21'), obtenidos por mutagénesis física y selección en campo (García *et al.*, 2003; Bermúdez-Caraballosa *et al.*, 2007).

Asimismo, ha permitido evaluar la respuesta de líneas de plantas de 'Grande naine' genéticamente transformadas vía *Agrobacterium tumefaciens* (Acosta-Suárez *et al.*, 2004) y se ha logrado la construcción de bibliotecas substractivas de ADNc de los genotipos 'Calcutta 4' y 'Niyarma yik' (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2004; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2005).

Además, se ha empleado para la evaluación de la variabilidad patogénica en diferentes aislados de *M. fijiensis* (Leiva-Mora *et al.*, 2006). También ha permitido la estandarización de un protocolo para la extracción de ARN de alta calidad a partir de hojas con síntomas y poder de este modo analizar molecularmente la interacción *Musa-M. fijiensis* (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2008; Portal, 2009).

Igualmente, ha permitido el análisis histológico y bioquímico de la interacción *Musa-M. fijiensis* (Sánchez-García *et al.*, 2009), así como evaluar la efectividad del control *in vitro* de *M. fijiensis* con bacterias aisladas de la filosfera de banano (Cruz-Martín *et al.*, 2009). Las herramientas bioinformáticas, para el estudio funcional de secuencias expresadas durante la interacción *Musa-M.fijiensis* requieren de un modelo experimental similar al expuesto en el presente protocolo para validar sus predicciones. Igualmente, podrá seguir aplicándose en programas de mejoramiento genético de *Musa*

spp., particularmente en la evaluación de genotipos de *Musa* spp. genéticamente transformados.

REFERENCIAS

Abadie C, Peyrachon T, Fouré E (1999) Lutte intégrée contre la maladie des raies noires des bananiers et des plantains au Cameroun. Developpement dun advertisement agricole. Biosciences proceedings, 6. Yaoundé, Cameroun

Acosta-Suárez M (2004) Evaluación temprana de la respuesta a la Sigatoka negra de genotipos de *Musa* spp. Tesis de maestría en agricultura sostenible. Universidad Central Marta Abreu de las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Instituto de Biotecnología de las Plantas.Santa Clara

Acosta-Suárez M, Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Leiva-Mora M, Roque B (2004) Evaluación temprana de la respuesta a Sigatoka negra con el empleo de suspensiones conidiales de *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton. Biotecnología vegetal 4 (2): 93-97

Alvarado-Capó Y, Leiva-Mora M, Dita Rodríguez MA.,Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Portal N, Kosky RG, García LR, Bermúdez-Caraballosa I, Padrón-Montesino J (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance on *Musa* spp breeding programme by the use mycelium suspension of *Mycosphaerella fijiensis* En : Jacome, L. (Ed.) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana: present status and outlook. Proceedings of the workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San José Costa Rica. INIBAP. Montpellier

Bermúdez-Caraballosa I, Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, García LR, Veitía N, Acosta-Suárez M (2007) Evaluación en casa de cultivo de cinco mutantes de porte bajo del híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) mediante la inoculación artificial de *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología vegetal 7(1):15-18

Bakry F, Carreel F, Christophe J, Horry JP (2009) Genetic improvement of banana. En: Jain SM, Priyadarsham PM (Eds). Breeding plantation tree crops: tropical species. Springer. New York

Bermúdez-Caraballosa I, Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, García L R, Veitía N, Acosta-Suárez M (2007) Evaluación en casa de cultivo de cinco mutantes de porte bajo del híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) mediante la inoculación artificial de *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología vegetal 7(1):15-18

Busogoro JP, Etame JJ, Harelimana G, Lognay G, Messiaen J, Lepoivre P, Van-Cutsem P (2004) Experimental evidence for the action of *M. fijiensis*

- toxins on banana photosynthetic apparatus. En: Jain, SM, Swennen, R (Eds.). Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations, pp. 161-170. Science Publishers. Enfield (NH)
- Carlier J, De-Waele D, Escalant JV (2002) Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos. Guías técnicas 6. INIBAP. Montpellier
- Carlier, J, De-Waele D, Escalant JV (2003) Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos. Guías Técnicas 7. INIBAP. Montpellier
- Chaerani R (2006) Early blight resistance in tomato: screening and genetic study Ph.D. thesis, Wageningen University. Wageningen
- Cruz-Martín M (2002) Caracterización de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet para su utilización en programas de mejoramiento de *Musa* sp. Tesis presentada para optar por el grado académico de Master en Biotecnología Vegetal. Fac. Ciencias Agropecuarias. IBP. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara
- Cruz-Martín M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Roque B (2004) Caracterización de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet para su utilización en programas de mejoramiento de *Musa* sp. Biotecnología vegetal 4 (1): 111-114
- Cruz-Martín M, Alvarado-Capó Y, Sánchez-García C, Acosta-Suárez M, Roque B, Leiva-Mora M (2009) Control *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* con bacterias aisladas de la filósfera de banano. Biotecnología Vegetal 9 (1): 61 – 64
- Daub EM, Ehrenshaft M (2000) The photoactivated cercospora toxin cercosporin: contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. Annual Review of Phytopathology 38: 461–90
- El-Hadrami A, Kone D, Lepoivre (2005) Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to Black Leaf Streak Disease. European Journal of Plant Pathology 113: 241-254
- El Hadrami A (2000) Caractérisation de la résistance partielle des bananiers à la maladie des raies noires et évaluation de la variabilité de l'agressivité de l'agent causal, *Mycosphaerella fijiensis*. Thèse d'Université. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique
- Fullerton R, Olsen RH (1995) Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 23: 39-48
- García LR, Pérez JN, Orellana P, Bermúdez-Carabaloso I, Veitía N, Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, Romero C, Acosta-Suárez M (2003) Evaluación temprana y en condiciones de campo de la resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet del cv. 'Gran enano' (AAA) obtenidas a través del cultivo de tejidos y la inducción de mutaciones. Biotecnología Vegetal 3 (2): 87- 92
- Gauhl F (1994) Epidemiology and Ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on Plantain and Banana (*Musa* spp.) in Costa Rica, Central America. INIBAP. Montpellier
- Harelimana G, Lepoivre P, Jijalkli H, 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 en opción del grado científico de Master en ciencia. CATIE. Costa Rica
- Jacome LH, Schuh W (1993) Spore production and artificial inoculation techniques for *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Tropical Agriculture Trinidad 70: 33 – 38
- Kosky RG, Del Sol L, Reyes VM, Freire-Seijó M, Posada-Pérez L, Herrera I, Escalant JV (2001) Embriogénesis somática en bananos y plátanos partiendo de flores masculinas inmaduras. Biotecnología vegetal 1: 29-35
- Leach R (1964) Report on investigations into the cause and control of the new banana disease in Fiji. Leg. Coun. Fiji, Coun
- Leiva-Mora M (1998) Estudios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet para La diferenciación de genotipos de *Musa* spp. en invernadero. Trabajo de diploma. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara
- Leiva-Mora M (2008) Evaluación temprana de la espuesta de *Musa* spp. a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. en casa de cultivo. Tesis doctoral. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara
- Leiva-Mora M, Dita MA, Acosta-Suárez M (2002) Empleo de diferentes inóculos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet para evaluar el comportamiento de dos cultivares de banano. Infomusa 11 (2): 41-42
- Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Roque B (2006) Variabilidad

- patogénica de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* sobre plantas del cultivar 'Grande naine' (AAA). Centro Agrícola 33 (4): 29-33
- Lepoivre P, Busogoro JP, Etame J, El-Hadrami A, Carlier J, Harelimana G, Mourichon X, Panis B, Riveros S, Sallé G, Strosse H, Swennen R (2003) Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica, pp 151-159. INIBAP. Montpellier
- Marín D, Romero R, Guzmán M, Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. Plant disease 87(3): 208-222
- Mendoza-Rodríguez M, Jiménez E, Maier F, Schäfer W, Bermúdez-Carballoso I, Padrón Y, Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Portal O (2004) Construcción de bibliotecas de ADNc a partir de hojas de los cultivares de banano 'Calcutta 4' y 'Niyarma Yik' inoculados con *Pseudocercospora fijiensis* Morelet. Biotecnología vegetal 4(1): 55-59
- Mendoza-Rodríguez M, Portal O, Sánchez-Rodríguez A, Maier F, Schaefer W, Alvarado-Capó Y, Bermúdez-Carballoso I, Padrón Y, Leiva-Mora M, Acosta-Suárez M, Jiménez E (2005) EST analysis of a cDNA library obtained from 'Niyarma yik' cultivar infected at late stage of infection with *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> con número de acceso: DQ002434, Mayo 2005)
- Meredith DS, Lawrence JS (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. Transaction British Mycology Society 52: 459-476
- Mobambo K, Pasberg-Gauhl C, Gauhl F, Zuofa K (1994) Early screening for black leaf streak / black Sigatoka disease resistance under natural inoculation conditions. Infomusa 3(2): 14-17
- Mourichon X, Peter D, Zapater M (1987) Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur jeunes plantules de bananier issues de culture *in vitro*. Fruit 42(4):195-198
- Mourichon X, Lepoivre P, Carlier J (2000) Fungal disease of the foliage. En: Jones, DR (Ed) Diseases of Banana, Abacá and Enset. Pp. 67-72. CABI Publishing, Wallingford, Oxford
- Mourichon X (1995) *Mycosphaerella fijiensis*, diversity and possibilities for the early screening of germplasm for resistance. En: Jones, DR (Ed) The improvement and testing of *Musa*: A global partnership. First Global conference of the international *Musa* testing program, La Lima, Honduras. pp. 47- 53. INIBAP. Montpellier
- 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
- Orjeda G (2000) Sigatoka disease trials. En: Orjeda G (Ed). Evaluating bananas: a global partnership. Results of IMTP Phase II INIBAP, Montpellier
- Pasberg-Gauhl, C, Gauhl F, Jones D (2000) Fungal disease of foliage. Sigatoka leaf spots. Black leaf streak. Distribution and economic importance. En: Jones, D (Ed.). Disease of banana, abaca and enset, pp. 37-44. CABI publishing, Wallingford, Oxford
- Pérez VL, Pérez MM, Jiménez MI, Jama M (2006) 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. Fitosanidad 10(1): 1-7
- Portal, O (2009) Development of molecular Tools to study the interaction between banana and *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of Black Leaf Streak Disease. PhD thesis. Ghent University, Belgium
- Robinson, JC (1996) Bananas and Plantains. Crop production science in Horticulture 5. CAB International. Wallingford
- Sánchez-García C, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Leiva-Mora M, Roque B (2009) Effect of artificial inoculation of *Mycosphaerella fijiensis* on the induction of defence-related enzymes in two *Musa* genotypes. Biotecnología Vegetal 9 (3): 169 – 176
- Sánchez-Rodríguez A, Portal VO, Rojas EL, Bárbara O, Mendoza-Rodríguez M, Acosta-Suárez M, Jiménez E, Hofte M (2008) An Efficient Method for the Extraction of High-Quality Fungal Total RNA to Study the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. interaction. Molecular Biotechnology 40(3):299-305
- Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of show-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67: 1051-1056
- Stover RH (1971) A proposed international scale for estimating intensity of Banana Leaf Spot (*Mycosphaerella musicola* Leach). Tropical Agriculture Trinidad 48: 185-196
- Twizeyimana M, Ojiambo PS, Tenkouano A, Ikotun T, Bandyopadhyay R (2007) Rapid screening of *Musa* species for resistance to black leaf streak using *in vitro* plantlets in tubes and detached leaves. Plant Disease 91: 308-314