

Efecto del filtrado de cultivo de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet sobre yemas adventicias de cultivares de *Musa* spp.

Lourdes García Rodríguez*, Lidcay Herrera, Justo Clavero., Idalmis Bermúdez, Novisel Veitia, Mayra Acosta.
*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e- mail: lougarcia@ibp.co.cu lougr2003@yahoo.es

RESUMEN

La obtención de bananos tolerantes o resistentes a la Sigatoka Negra es una imperiosa necesidad a partir de su aparición en Cuba. Por ello se estudió el efecto del filtrado de cultivo de diferentes cepas del hongo sobre yemas adventicias de los cultivares Gran Enano (AAA) (susceptible) y Pellipita (ABB) (resistente) con el objetivo de determinar posibles diferencias entre los mismos, así como obtener la cepa más efectiva y la dilución óptima. Se utilizaron yemas adventicias de estos cultivares formadas en un medio de cultivo con altas concentraciones de 6 BAP y luego se subcultivaron al medio de cultivo selectivo, que contenía diferentes diluciones del filtrado de cultivo de las cepas C-27, C-21, y C-19. Se evaluó a los 15 y 30 días el incremento del peso fresco de los explantes y el porcentaje de crecimiento y mortalidad, encontrándose diferencias entre el cultivar susceptible y el resistente con las diluciones más concentradas. Los mejores resultados de diferenciación se obtuvieron con la dilución 1:5 (v/v). Las cepas estudiadas mostraron distintos efectos sobre los explantes. Se encontraron diferencias significativas cuando se utilizaron las cepas C-19 y C-21, no siendo así con la C-27. Se observó una estimulación del crecimiento de los explantes de ambos cultivares en el tratamiento control que contenía los componentes del medio de cultivo del hongo, descartándose así la posibilidad de cualquier tipo de toxicidad de estas sustancias sobre las yemas adventicias que pudieran enmascarar los resultados.

Palabras clave: cepas, cultivo de tejidos, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, selección *in vitro*, Sigatoka negra

ABSTRACT

The obtaining of bananas tolerant or resistant to the Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) is an imperious need since 1991 with its apparition in our country. The effect of the culture filtrate was studied on different strain of the fungus on adventitious buds of the cultivar Grande Naine (AAA) (susceptible) and Pellipita (ABB) (resistant) with the objective of determining possible differences between these cultivars the most effective strain and the optimum dilution. Adventitious buds of these cultivars formed in a cultivation medium with high concentrations of 6 BAP were utilized and then they were subcultivated on the selective medium that contained different dilutions of culture filtrate of the strains C-27, C-21, and C-19. It was evaluated at 15 and 30 days the fresh weight increment of the explants and the percentage of growth and mortality, being found differences between the susceptible cultivar and the resistant one with the most concentrated dilutions. The best results of differentiation were obtained with the dilution 1:5 The strains studied showed different effects on the explants. Significant differences were founded when C-21 and C-19 were used, not been so with the C-27. Growth stimulation was observed in both cultivars in the control treatment that contained the components of the fungus culture medium, discarding so any type of toxicity of these substances on the adventitious buds that could disguise the results.

key words: Black Sigatoka, *in vitro* selection, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, strains, tissue culture

INTRODUCCIÓN

El cultivo del plátano, debido a la amplia aceptación de su fruto y la facilidad con que se propaga por vía vegetativa, ha alcanzado gran difusión en las áreas tropicales, donde constituye uno de los elementos básicos en la dieta de la población.

La preocupación de dar un enfoque de mayor alcance al mejoramiento de *Musa* ha aumentado considerablemente, debido fundamentalmente a la presencia de la enfermedad conocida como Sigatoka negra causada por el hongo *M. fijiensis* Morelet.

Esta enfermedad provoca una defoliación severa la cual disminuye el rendimiento en más del 50%, al ocasionar una baja producción de frutos, lo que hace que el cultivo no sea rentable (Pérez, 1996).

Se han desarrollado diferentes programas de mejoramiento genético con el propósito de obtener cultivares resistentes a esta enfermedad. Sin embargo, los cultivares comerciales son triploides, con frutos partenocápicos y semilla sexual estéril, condiciones que reducen la variabilidad genética y la posibilidad de hacer hibridaciones, haciendo difícil aplicar los métodos convencionales de mejoramiento genético en plátano y banano.

El uso de toxinas de patógenos, como agentes de selección *in vitro*, es un de las técnicas que se utilizan para obtener somaclones resistentes a una enfermedad, teniendo como premisa fundamental que la resistencia debe manifestarse a nivel *in vitro*. Para ello generalmente se estudia la respuesta de variedades de comportamiento conocido en cuanto a la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad y su posible diferenciación a este nivel. En este caso el estudio de las toxinas producidas por *Pseudocercospora fijiensis* es una de las principales prioridades que deben investigarse según el informe de INIBAP presentado por el grupo de Sigatoka (Frison *et al.*, 1997) y la 3ra. Reunión de trabajo del grupo de Sigatoka de PROMUSA (Jácome *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto es que se decide la realización de este trabajo que tuvo como objetivo fundamental estudiar el efecto del filtrado de cultivo de diferentes cepas de *P. fijiensis* sobre yemas adventicias de cultivares susceptibles y resistentes a la enfermedad y determinar la concentración mínima para encontrar diferenciación entre cultivares a este nivel de organización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Ápices de los cultivares Gran enano (AAA) y Pellipita (ABB) susceptible y resistente a la enfermedad, respectivamente fueron establecidos *in vitro* según la metodología propuesta por Orellana (1994). Una vez desarrollados los explantes fueron subcultivados para la formación de yemas adventicias en un medio de cultivo con altas concentraciones de 6-BAP compuesto por las sales MS, 1mg.l⁻¹ de Tiamina, 2% de sacarosa y 15mg.l⁻¹ de 6-BAP.

Obtención del filtrado de cultivo de *P. fijiensis* Morelet

Se utilizaron tres cepas del hongo C-19, C-21 y C-27, obtenidos de la provincia de Camagüey, los cuales crecieron en un medio de cultivo M-1-D durante 30 días, que se incubó a una temperatura de 28°C. Al cabo de este tiempo el micelio del hongo fue eliminado filtrando el cultivo, el cual se concentró 10 veces por rotoevaporación a una temperatura de 40°C.

Este extracto fue añadido al medio de cultivo para la multiplicación de las yemas una vez esterilizado a través de filtros Milliporo (22µm).

Procedimiento

Se estudiaron diferentes diluciones (v/v) del filtrado de cultivo concentrado para cada una de las cepas como se muestra a continuación: 0, 1:5, 1:10, 1:15.

Se utilizó para cada dilución un control con el medio de cultivo del hongo (M-1-D) para evaluar el efecto que

podían ejercer los componentes del mismo sobre el crecimiento de las yemas adventicias. Se colocaron cinco explantes por frasco y se emplearon siete frascos de cultivo por tratamiento.

Se evaluó el incremento del peso de los explantes a los 15 y 30 días, además del porcentaje de explantes con crecimiento o necrosis en las diferentes diluciones.

Con los resultados obtenidos se desarrolló un segundo experimento para evaluar el efecto de mayores concentraciones del agente selectivo y se utilizaron las diluciones 1:10, 1:5, y 1:3 del filtrado de cultivo proveniente del aislado C-21. Se evaluó el porcentaje de crecimiento y de necrosis para cada tratamiento. Para las pruebas estadísticas se realizaron análisis de varianza de clasificación simple y un modelo multifactorial con y sin interacción. Para determinar los grupos homogéneos y/o significativamente diferentes, a un nivel de 5.0%, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan ya que se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los datos. El procesamiento de los datos se realizó con los paquetes estadísticos SPSS/PC ver 9.00 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se utilizó el medio de cultivo M-1-D como control se pudo comprobar que en ninguna de las diluciones estudiadas se observó disminución del crecimiento de los explantes en los cultivares estudiados, encontrándose una estimulación significativa del crecimiento del cv. Gran Enano en la dilución 1:10, lo que descarta cualquier posibilidad de enmascaramiento en los resultados provocado por los componentes de este medio de cultivo (Figura 1).

El medio de cultivo M-1-D en su composición es fundamentalmente salino y ha sido utilizado por varios investigadores para la producción de metabolitos fitotóxicos de *P. fijiensis* Morelet (Hernández, 1995; Okole y Shulz, 1997).

Al analizar el efecto que produjo el extracto proveniente de las tres cepas se observó que cuando se utilizó la C-27 no se obtuvieron diferencias significativas entre el cultivar resistente y el susceptible en ninguna de las diluciones estudiadas, lo que pudiera deberse a una baja producción de compuestos fitotóxicos por parte de esta cepa, que no permitió un efecto detrimental en el cultivar susceptible. Por los resultados obtenidos esta cepa fue descartada para posteriores pruebas *in vitro*.

Este comportamiento demuestra la importancia de la selección inicial del aislado a utilizar para la obtención del filtrado tóxico y la necesidad de estudiar el efecto y la virulencia de cada una (Cruz, 2003). De esta forma se podrá obtener un filtrado final que permita la realización exitosa de experimentos de diferenciación sin que constituya este un factor limitante.

Las diferencias de comportamiento de diferentes aislados de este patógeno en su interacción con cultivares de *Musa* ha sido referida por otros autores como Fullerton y Olsen (1995) y Cruz (2003).

Resultados completamente diferentes fueron obtenidos con los restantes aislados, donde se observaron desde la primera evaluación a los 15 días diferencias en la disminución del incremento del peso de las yemas adventicias de Gran Enano en la

dilución 1:5, sin embargo no fue hasta la evaluación de los 30 días cuando se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Con el filtrado de cultivo de la cepa C-21 se encontraron diferencias entre los cultivares con las diluciones 1:15 y 1:5, no siendo así con la dilución 1:10 (Figura 2). Cuando se utilizó el filtrado de cultivo proveniente de la cepa C-19 sólo se encontraron diferencias con la dilución 1:5 (Figura 3).

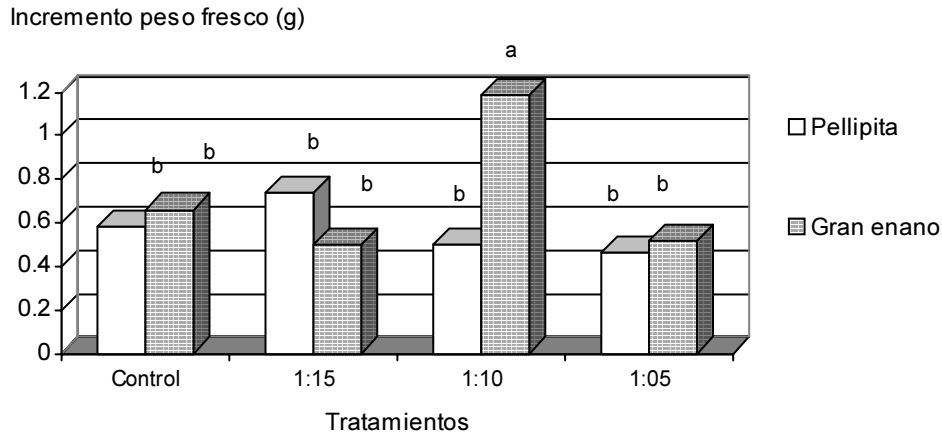


Figura 1. Efecto del medio de cultivo M-1-D sobre el peso fresco de yemas adventicias de los cultivares Pellipita y Gran Enano.

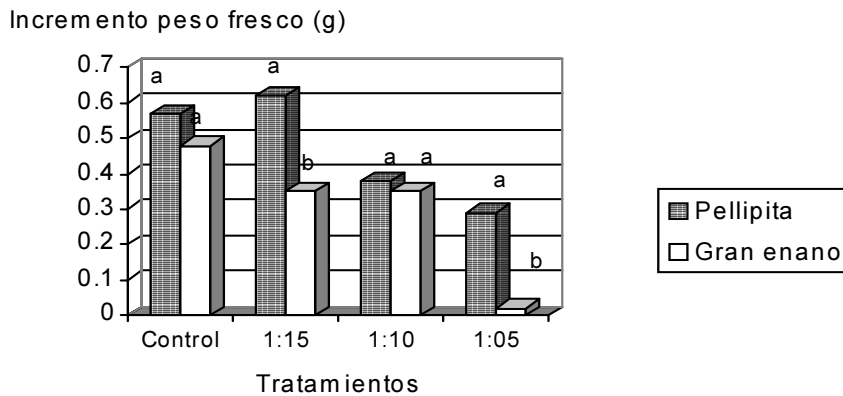


Figura 2. Efecto de las diluciones del filtrado de cultivo de *P. fijiensis* (aislado C-21) en el incremento del peso de yemas adventicias de dos cultivares de *Musa* a los 30 días de cultivo.

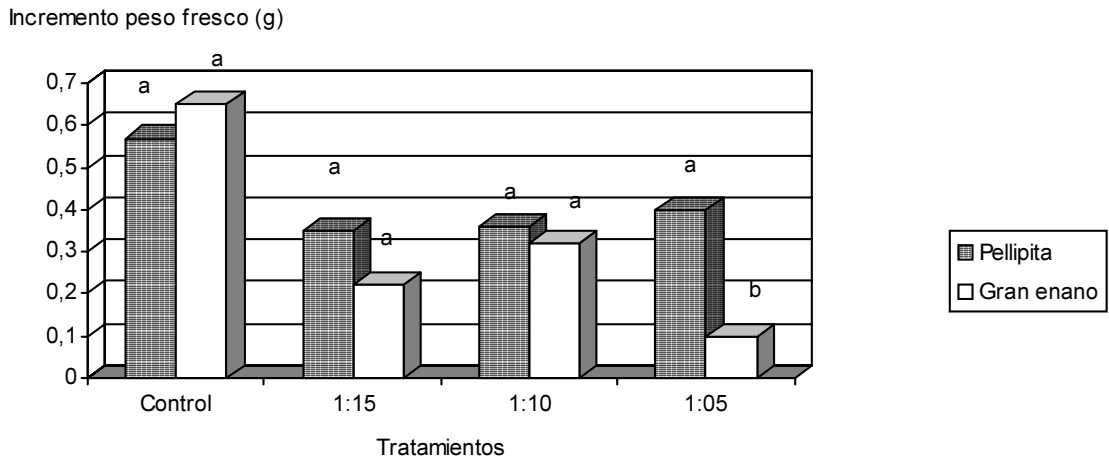


Figura 3. Efecto de las diluciones del filtrado de cultivo de *P. fijiensis* (cepa C-27) en el incremento del peso de yemas adventicias de dos cultivares de *Musa* a los 30 días de cultivo.

Hernández (1995) expuso callos embriogénicos de los cultivares Gran Enano y Calcutta 4 a diferentes concentraciones de extracto crudo de *P. fijiensis* en concentraciones entre 160 y 200 mg, lo cual le permitió verificar sus grados de resistencia de altamente susceptible y de altamente resistente.

Cuando se evaluaron los porcentajes de necrosis de las yemas adventicias se observó un comportamiento similar en los dos cultivares para los dos aislados en las diferentes diluciones. Se encontraron los mayores valores de necrosis para el cultivar susceptible en la dilución 1:5 en ambos aislados (Figura 4).

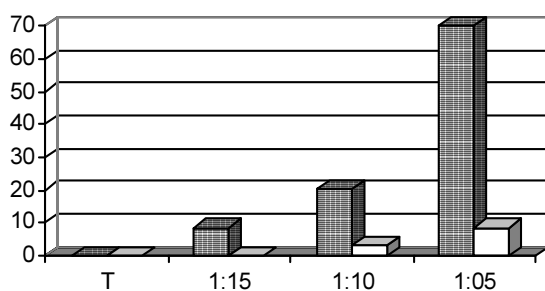
En el segundo experimento se recomprobaron las diferencias encontradas entre cultivares para la dilución 1:5 y se observó que cuando aumentó la concentración del agente selectivo se incrementó el porcentaje de yemas afectadas, inclusive en el cultivar resistente (Tabla 1). Por ello se decidió tomar la dilución 1:5 como la concentración mínima indispensable para diferenciar a nivel de yemas estos cultivares y tomarla como base para el desarrollo de la selección *in vitro* ya que se lograron porcentajes de mortalidad de 68% .

Con estos estudios se demostró que es posible la diferenciación entre cultivares de *Musa* cuando son expuestos al filtrado de cultivo de *P. fijiensis*, lo que abre el camino para el desarrollo de una metodología de selección que permita obtener somaclones o mutantes resistentes a las toxinas del hongo para su posterior evaluación de la resistencia a la enfermedad en experimentos en condiciones de campo.

Varios autores han logrado establecer diferencias entre cultivares, en cuanto a su respuesta a la Sigatoka negra. Entre ellos Mourichon *et al.* (1987) quienes realizaron inoculaciones en hojas de plantas *in vitro* de tres cultivares diferentes utilizando conidios. Estos presentaron diferente respuesta al ataque del hongo a partir de los 38 días de iniciado el experimento.

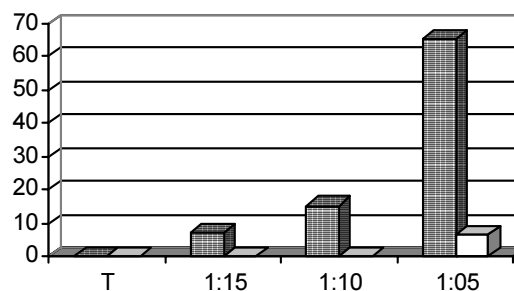
El desarrollo de metodologías de selección temprana de cultivares de *Musa* con resistencia a Sigatoka negra es una prioridad de trabajo resaltada por varios autores para garantizar mayores posibilidades de éxito en los programas de mejoramiento genético de bananos (Frison *et al.*, 1997; Leiva, 1998; Alvarado *et al.*, 2003).

Porcentaje de mortalidad (%)



Aislado C-21

Porcentaje de mortalidad (%)



Aislado C-19

Figura 4. Efecto de las diluciones del filtrado de cultivo de *P. fijiensis* Morelet sobre el porcentaje de mortalidad de las yemas adventicias en dos cultivares de *Musa* a los 30 días de cultivo.

Tabla 1. Comportamiento del crecimiento y la mortalidad de yemas adventicias de Pellipita y Gran Enano en diferentes diluciones del filtrado de cultivo de *P.fijiensis*.

Evaluación	Concentraciones v/v	Gran Enano	Pellipita
% Crecimiento	control	100a	100a
	1:10	88a	100a
	1:5	32 b	95 a
	1:3	16 b	60 a
% Necrosis	control	0	0
	1:10	12	0
	1:5	68	5
	1:3	84	40

Para la variable Porcentaje de crecimiento, medias con letras no comunes en una misma fila difieren según la prueba de Duncan para $p < 0.05$.

CONCLUSIONES

Cuando se expusieron yemas adventicias del cultivar Pellipita (resistente) y Gran enano (susceptible), al cultivo filtrado de *P. fijiensis* Morelet, se observó un efecto diferencial entre ellos.

El medio de cultivo M-1-D no influyó negativamente sobre el crecimiento de los explantes de ambos cultivares para las diluciones estudiadas.

Se encontraron diferencias cuando se utilizaron los filtrados de cultivo provenientes de las cepas C-19 y C-21 no siendo así para la cepa C-27.

La concentración mínima efectiva del extracto a la cual se logró diferenciar estadísticamente los cultivares fue la dilución 1:5.

REFERENCIAS

- Alvarado, CY, Leiva MM, Rodríguez MA, Acosta M, Cruz MM, Portal N, Kosky GR, García L, Bermúdez I, Padrón J (2003) Early evaluation of Black leaf streak resistance on *Musa* spp. y breeding program by the use of mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. 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. 169-175. INIBAP. Montpellier
- Cruz, MM (2003) Caracterización de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet para su utilización en programas de mejoramiento de *Musa* sp. Tesis presentada en opción del Grado Académico Master en Biotecnología vegetal. IBP. UCLV. Santa Clara
- Frison, E, Orjeda G, Sharrock S (eds.) (1997) Proceedings of meeting held in Gosier, Guadalupe. International network for the improvement of banana and plantain. INIBAP. Montpellier
- Fullerton, RA y Olsen TL (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
- 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 Magister scientiae. CATIE.
- Jácome, L (2003) Population biology and epidemiology. En: Jácome L, Lepoivre, 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. 107-110. INIBAP Montpellier
- Leiva, M (1998) Estudio de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet para la diferenciación de genotipos de *Musa* spp. en invernadero. Trabajo de Diploma. UCLV, Cuba. Santa Clara
- Mourichon, X, Peter D, Zapater M (1987) Inoculation experimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur jeunes plantules de bananier issues de culture *in vitro*. Fruit 45(4): 195-198
- Okole, B y Shulz F (1997) Selection of *Mycosphaerella fijiensis*-resistant cell lines from micro-cross selection of banana and plantain. Plant Cell Reports 16: 339-343
- 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. Santa Clara
- Pérez, L (1996) Manual para el manejo integrado de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder) en banano y plátano. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Instituto de Investigaciones de Sanidad vegetal. Ministerio de la Agricultura de la República de Cuba. La Habana