

Evaluación en casa de cultivo de la respuesta a la Sigatoka negra de dos cultivares de *Musa* mediante la inoculación artificial de suspensiones conidiales de *Pseudocercospora fijiensis*

Mayra Acosta Suárez*, Yelenys Alvarado Capó, Mileidy Cruz Martín, Michel Leiva Mora y Berkis Roque Morales.
* Autor para correspondencia. e-mail: mayra01a@yahoo.es

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830

RESUMEN

Para la evaluación de la resistencia a la Sigatoka negra en genotipos procedentes de programas de mejoramiento genético se han empleado diferentes métodos entre los que se encuentra la inoculación artificial con estructuras de reproducción del patógeno. Sin embargo, se precisa estandarizar las condiciones para su obtención *in vitro* y conocer la respuesta en casa de cultivo de cultivares de respuesta conocida en campo a dicha enfermedad. Con ello se podrán establecer métodos adecuados de evaluación y selección de nuevos genotipos resistentes. Con los objetivos de evaluar diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para la obtención de conidios de *P. fijiensis* así como la respuesta de dos cultivares de *Musa* a la inoculación artificial con suspensiones conidiales de este hongo, se realizó este trabajo. Se probaron diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para la obtención de conidios y se utilizaron los cultivares Grande naine (susceptible) y FHIA-18 (parcialmente resistente). Los conidios de *P. fijiensis* pudieron ser obtenidos *in vitro* a 20°C y luz constante a partir de los 10 días de incubación en los medios de cultivo Agar Papa Zanahoria, Agar V-8 modificado y Agar Papa y Dextrosa, no obstante la mayor concentración se alcanzó en Agar Papa y Dextrosa a los 20 días de incubación a 20°C y luz fluorescente blanca continua. Mediante el empleo de una escala cualitativa del estado de los síntomas y las variables cuantitativas tiempo de evolución de los síntomas y tiempo de desarrollo de la enfermedad se pudieron diferenciar ambos cultivares que mantuvieron en casa de cultivo una respuesta similar a la observada en campo.

Palabras clave: conidios, esporulación, FHIA-18, Grande naine, medios de cultivo

ABSTRACT

For evaluating the resistance of Black sigatoka in genotypes from breeding programmes different methods have been used, the artificial inoculation of pathogens reproduction structures is one of them. Nevertheless, is necessary the standardization of condition for it *in vitro* production and to know the response of cultivars to the diseases in greenhouse. It will permit to establish methods for evaluating and selecting the new resistant genotypes. This work was carried out with the objectives to evaluate different culture media and incubation conditions for obtaining *P. fijiensis* conidia and for evaluating the response of two cultivars to the artificial inoculation with conidial suspensions of this fungus. Different culture media and incubation conditions for obtaining the conidia and the cultivars Grande naine (susceptible) and FHIA-18 (partially resistant) were used. The conidia of *P. fijiensis* could be obtained *in vitro* at 20°C and constant light from 10 days of incubation in culture media Potato Carrot Agar, modified V-8 Agar and Potato Dextrose Agar. However, the greatest concentration was reached in Potato Dextrose Agar after 20 days of incubation at 20°C under continuous white fluorescent light. The artificial inoculation of conidial suspensions of *P. fijiensis* allowed to evaluate the response of Grande Naine and FHIA-18 cultivars in greenhouse. By the use of qualitative scale of symptoms stages and the quantitative variables symptoms evolution time and disease development time was possible to differentiate both cultivars. They maintained in greenhouse similar response to the disease that in the field.

Key words: conidia, culture medium, FHIA-18, Grande naine, sporulation

INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra es producida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (*Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, anamorfo). También se conoce como el estriado negro de la hoja y es considerada la enfermedad foliar más destructiva y costosa de los plátanos y bananos a nivel mundial (Carlier *et al.*, 2000, Pasberg-Gauhl *et al.*, 2000).

Para la evaluación de la resistencia a esta enfermedad en genotipos procedentes de programas de

mejoramiento genético se han empleado diferentes métodos entre los que se encuentra la inoculación artificial con estructuras de reproducción del patógeno (Mobambo *et al.*, 1994). Sin embargo, se precisa estandarizar las condiciones para su obtención *in vitro*.

La inoculación artificial de plantas procedentes del cultivo de tejidos mediante el empleo de suspensiones conidiales del hongo resulta ser un método fácil, rápido y reproducible para conocer la respuesta de diferentes cultivares frente a *M. fijiensis*.

Sin embargo, a menudo la producción de conidios de este patógeno se ve limitada por el carácter fluctuante de la esporulación *in vitro* durante los subcultivos sucesivos (Mourichon *et al.*, 1987; Cruz, 2003) y por la pérdida de la capacidad de producción de conidios bajo estas condiciones (Meredith y Lawrence, 1969). Es por ello que se precisa estandarizar las condiciones para su obtención *in vitro*.

Con los objetivos de evaluar diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para la obtención de conidios *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton y evaluar la respuesta de dos cultivares de *Musa* a la inoculación artificial con suspensiones conidiales de *P. fijiensis* se realizó este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de diferentes medios de cultivo para la obtención de conidios de *P. fijiensis*

Aislado

Se utilizó el aislado CCIBP-Pf39 de *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton perteneciente a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas.

Medios de cultivo

Se utilizaron los medios de cultivo sólido: Agar Mycophil (BBL), Agar Papa y Dextrosa (BioCen), Agar Dextrosa de Sabouraud (BioCen), Agar V-8 modificado (Mourichon *et al.*, 1987), Agar Extracto de Malta (extracto de malta: 50 g.l⁻¹, dextrosa: 5 g.l⁻¹, pH 5.6±0.2) y Agar Papa Zanahoria (papa: 200g.l⁻¹, zanahoria: 200g.l⁻¹, pH 5.6±0.2). Los tres últimos solidificados con 20g.l⁻¹ de agar.

Inoculación

Se inocularon 300µl de una suspensión micelial (10⁵ fragmentos de micelio.ml⁻¹) en tubos de ensayo de 150 x 22 mm con 15ml de los medios de cultivo inclinado. Estos se incubaron a 20°C en cámara climatizada *Gallenkamp* con luz fluorescente blanca fría continua de 60 µmoles.m⁻².s⁻¹ durante 10 días, según lo descrito por Carlier *et al.* (2002) (Figura 1).

Transcurrido este período de tiempo, se adicionaron a los tubos 5ml de agua desionizada estéril más Tween 80 al 0.05%. Se removieron en agitador vortex (Heidolph Top Mix 94 323) a 7 rpm durante 1 minuto para la separación de los conidios del micelio del hongo (Figura 2).



Figura 1. Condiciones de incubación para la obtención de conidios de *P. fijiensis* en diferentes medios de cultivo.



Figura 2. Preparación de suspensiones conidiales de *Pseudocercospora fijiensis* mediante la utilización del Vortex.

Se evaluó la concentración de conidios. ml^{-1} en cada medio de cultivo. Esta se determinó en cámara de Neubauer por observación al microscopio óptico *Olympus* (aumento 100x).

Evaluación de dos temperaturas de incubación para la obtención de conidios de *P. fijiensis*

Este ensayo se realizó con el objetivo de conocer la temperatura de incubación adecuada para obtener la mayor concentración de conidios de *P.fijiensis*.

Se utilizaron para ello, los medios de cultivo de mejores resultados del experimento anterior y se siguió un protocolo similar al descrito en el mismo. Se evaluó la concentración de conidios a las temperaturas de incubación de 20°C y 25°C.

Evaluación de tres tiempos de incubación para la obtención de conidios de *P. fijiensis*

Con el objetivo de determinar el tiempo de incubación adecuado para la obtención de conidios de *P. fijiensis* se realizó este experimento.

Se utilizaron los medios de cultivo de mejores resultados del experimento anterior y se siguió un protocolo similar al descrito en el mismo. Se evaluó la concentración de conidios a los 10, 20 y 30 días de incubado.

Procesamiento estadístico de los datos

El procesamiento estadístico de la variable evaluada se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 9.0 para Windows. Los datos se analizaron por medio de un ANOVA de clasificación simple y las diferencias entre las medias se procesaron a través de la Prueba de Dunnett's C.

Evaluación de la respuesta de dos cultivares de *Musa* a la inoculación artificial con suspensiones conidiales de *P. fijiensis*

Se utilizaron plantas obtenidas *in vitro* de los cultivares de banano: Grande naine (susceptible) y FHIA-18 (parcialmente resistente). Las mismas se mantuvieron en fase de aclimatización durante 45 días en bandejas de polieturano (70 alvéolos) con sustrato compuesto por 50% de casting, 30% de compost y 20% de zeolita. Posteriormente se transfirieron a recipientes plásticos de 10 cm de diámetro con 500 ml de capacidad con igual sustrato por 45 días más hasta alcanzar como mínimo 20 cm de alto y al menos tres hojas activas.

Las mismas se inocularon con suspensiones conidiales (10^5 conidios. ml^{-1}) con gelatina al 1%. La inoculación se realizó con un pincel sobre el envés de las tres hojas más jóvenes totalmente extendidas (Figura 4).



Figura 3. Plantas aclimatizadas de dos cultivares de *Musa* en casa de cultivo.



Figura 4. Inoculación de suspensiones conidiales de *P. fijiensis* por el envés de hojas de *Musa* spp.

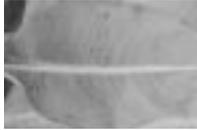
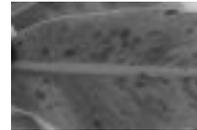
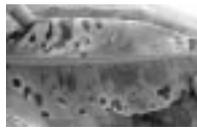
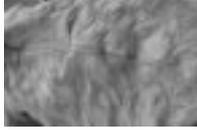
Se esperaron dos horas hasta que se secan las hojas, luego se elevó la humedad relativa al 100% durante tres días y después se garantizó una humedad relativa por encima del 70%. Se inocularon 10 plantas y, además, se incluyeron 10 plantas sin inocular para ser utilizadas como controles. Las mismas se ubicaron completamente al azar en una casa de cultivo. Diariamente se registró la temperatura y la humedad relativa mínima y máxima mediante un Termohigrómetro electrónico (EM-913) (Oregon Scientifit). El experimento se evaluó cada siete días desde la inoculación hasta los 63 días. En cada cultivar, se evaluaron los siguientes aspectos:

- *Período de incubación*: Tiempo entre la infección y la aparición de las primeras lesiones puntiformes por el envés de la hoja (días).

- *Período de transición o tiempo de evolución de los síntomas*: Número de días entre la aparición de los primeros síntomas (lesiones puntiformes) y la aparición de manchas necróticas con centros secos.

- *Desarrollo de la enfermedad en el tiempo*: Período entre la inoculación y la aparición de lesiones maduras (manchas necróticas con centros secos). Para la evaluación cualitativa del desarrollo de los síntomas se utilizó la escala propuesta por Alvarado *et al.* (2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Escala para la evaluación cualitativa del desarrollo de los síntomas en hojas de *Musa spp.* inoculadas con *Pseudocercospora fijiensis* Morelet (Alvarado *et al.*, 2003).

Estado	Descripción de los síntomas	
0	Hoja sin síntoma.	
1	Hoja con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz.	
2	Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el envés de la hoja y sin síntomas por el haz.	
3	Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz.	
4	Hoja con manchas negras (elípticas o redondeadas) con bordes cloróticos y halo acuoso. La hoja mantiene áreas de tejido verde.	
5	Hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y colgar del pseudotallo.	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de diferentes medios de cultivo para la obtención de conidios de *P. fijiensis*

Se obtuvieron conidios de *P. fijiensis* en todos los medios de cultivos ensayados a partir de los 10 días de incubación a la temperatura de 20°C y luz constante y sus características coincidieron con las referidas en la literatura científica para esta especie (Carlier *et al.*, 2002) (Figura 5).

La mayor concentración de conidios se logró en los medios de cultivo Agar Papa y Dextrosa, Agar Papa Zanahoria y Agar V-8 modificado y no existieron diferencias estadísticas significativas entre ellos (Tabla 2). Estos resultados constituyen una alternativa para la obtención de conidios *in vitro* ya que se pueden utilizar otros medios de cultivo sintéticos como el Agar Papa y Dextrosa y no solo el Agar V-8 referido en la literatura científica para estos fines (Carlier *et al.*, 2002).

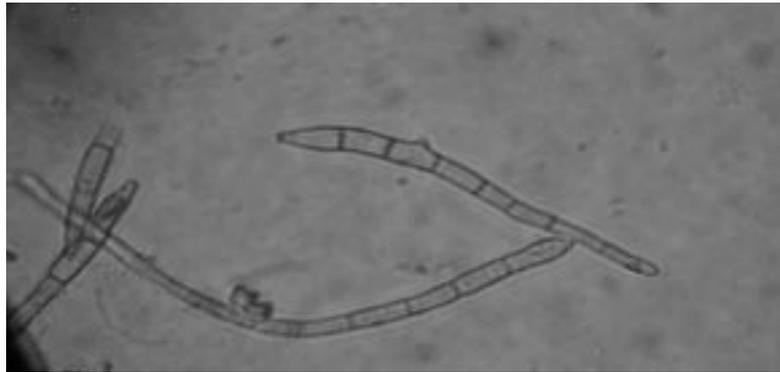


Figura 5. Conidios de *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton.

Tabla 2. Concentración de conidios de *Pseudocercospora fijiensis* en medios de cultivo sólido.

Medios de cultivo	Concentración de conidios (10^5 Conidios.ml ⁻¹)
Agar Extracto de Malta	0.32 c
Agar Dextrosa de Sabouraud	0.36 bc
Agar Mycophil	0.70 b
Agar V-8 modificado	2.29 a
Agar Papa Zanahoria	2.35 a
Agar Papa y Dextrosa	2.52 a
Error Estándar	± 0.20

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por Prueba de Dunnett's C para $P < 0.05$.

Hadana *et al.* (2002) no lograron esporulación en el medio de cultivo Agar Papa Zanahoria a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo.

El medio de cultivo V-8 ha sido empleado por varios investigadores para la obtención de conidios con buenos resultados (Mourichon *et al.*, 1987; Mata *et al.*, 1994; Ceres y Menezes, 2001). También Fullerton y Olsen (1995); González (1999); Ceres y Menezes (2001) y Hadana *et al.* (2002) lograron obtener conidios en medio de cultivo Agar Papa y Dextrosa.

Además de estos medios de cultivo, se han utilizado otros para la obtención de conidios de *P. fijiensis*. Entre ellos se encuentran el Agar Czapek

y el Agar Maltosa Peptona Avena (Ceres y Menezes, 2001).

Evaluación de dos temperaturas de incubación para la obtención de conidios de *P. fijiensis*

Al evaluar la concentración de conidios en los medios de cultivo de mejores resultados del experimento anterior (Agar Papa y Dextrosa, Agar Papa Zanahoria y Agar V-8 modificado) a 20°C y a 25°C se comprobó que no existieron diferencias estadísticas significativas a las dos temperaturas para los medios de cultivo Agar Papa Zanahoria y Agar V-8 modificado a los 10 días de incubación. Sin embargo, en Agar Papa y Dextrosa a 20°C se observó la mayor concentración de conidios (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de conidios de *P. fijiensis* a dos temperaturas de incubación.

Medios de cultivo	Concentración de conidios ($\times 10^5$ conidios.ml ⁻¹)		Error estándar
	20°C	25°C	
Agar V-8 Modificado	2.29 a	1.85 a	
Agar Papa Zanahoria	2.35 a	2.37 a	± 0.20
Agar Papa y Dextrosa	2.52 a	0.88 b	

Medias con letras no comunes en una misma fila difieren por Prueba de Dunnett's C para $P < 0.05$.

Diferentes temperaturas de incubación se han utilizado *in vitro* para la producción de conidios de *P. fijiensis*. Williams (1990) probaron 21°C y 30°C. Por su parte, Jacome y Schuh (1993) utilizaron 20°C y obtuvieron 5×10^3 conidios. ml^{-1} en el medio de cultivo Mycophil. En cuanto a esto, Carlier *et al.* (2002) demostraron que la esporulación de *P. fijiensis* ha sido lograda en algunos medios de cultivo sólido siendo óptima a 20°C. Por otra parte, Mouliom-Pefoura (1995) y Cruz (2003) alcanzaron una concentración de 10^5 conidios. ml^{-1} a 20°C.

Otros investigadores obtuvieron conidios de *P. fijiensis* a la temperatura de 25°C (Mourichon *et al.*, 1987; Jacome y Schuh, 1992; Fullerton y Olsen, 1995; Romero y Sutton, 1997; Ceres y Menezes, 2001 y Hadana *et al.*, 2002).

Evaluación de tres tiempos de incubación para la obtención de conidios de *P. fijiensis*

Según los resultados de varias investigaciones es posible obtener conidios de *P. fijiensis* en diferentes tiempos de incubación, sin embargo la mayoría coincide en que se requieren al menos diez días para lograr una cantidad apreciable de dichas estructuras de reproducción (Carlier *et al.*, 2000). Los resultados de este experimento corroboraron el planteamiento anterior.

En el medio de cultivo V-8 se pudieron cuantificar 2.29×10^5 conidios. ml^{-1} a los 10 días y se mantuvieron en ese orden hasta los 30 días sin diferencias estadísticas significativas entre ellos. En Agar Papa Zanahoria la mayor concentración de conidios se logró a los 10 días de incubación, mientras que en Agar Papa y Dextrosa se obtuvieron a los 20 días 5.91×10^5 conidios. ml^{-1} , valor que resultó ser el más alto de todos los tratamientos (Tabla 4).

Mourichon *et al.* (1987), plantearon que colonias de 10-21 días podían producir conidios. En cuanto a esto, Jacome y Schuh (1992) obtuvieron conidios de 14 a 18 días de incubación. Estos mismos investigadores pero en el año 1993, a los 24 días, en medio de cultivo Agar Mycophil lograron hasta 10^6 conidios. ml^{-1} . Por su parte, Mata *et al.* (1994) y Leiva (1998) observaron conidios a los 14 días de incubación, mientras que Fullerton y Olsen (1995) emplearon un tiempo 14 a 21 días para su colecta. Romero y Sutton (1997) en 15 días cuantificaron $0.23-2.23 \times 10^3$ conidios. día^{-1} .

Evaluación de la respuesta de dos cultivares de *Musa* a la inoculación artificial con suspensiones conidiales de *P. fijiensis*

Al inocular suspensiones conidiales de *P. fijiensis* sobre hojas de los cultivares Grande naine y FHIA-18 se logró reproducir el comportamiento de ambos frente a la enfermedad en condiciones naturales.

Para los dos genotipos de *Musa* spp. evaluados los primeros síntomas se observaron a los 14 días después de la inoculación (periodo de incubación). En el cultivar Grande naine los síntomas, después de su aparición (pequeñas lesiones puntiformes por el envés, estado 1, Alvarado *et al.*, 2003), evolucionaron hacia manchas necróticas (manchas negras circulares, con halo clorótico o centro seco gris, (estados 4 ó 5, Alvarado *et al.*, 2003) en 35 días. En el FHIA-18 los síntomas evolucionaron más lentamente y no se observaron manchas necróticas con centro seco. Al final del periodo de evaluación (63 días) cuando ya las plantas de Grande naine habían perdido la totalidad de su área foliar por los daños ocasionados por el patógeno, en este cultivar solo se habían observado manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz. Este comportamiento de los dos cultivares se correspondió con el observado en condiciones naturales donde el Grande naine muestra una evolución rápida de los síntomas y el FHIA-18 un progreso lento de los mismos. Atendiendo a este resultado no pudieron ser calculados el tiempo de evolución de los síntomas y el tiempo de desarrollo de la enfermedad. Las variables cuantitativas utilizadas aún cuando no pudieron ser calculadas para el FHIA-18 (no se alcanzó el estado de mancha con centro seco en 63 días de evaluación) permitieron diferenciarlos (Tabla 5).

Romero y Sutton (1997) utilizaron suspensiones conidiales de *M. fijiensis* para estudiar la respuesta de FHIA-01 y FHIA-02 a la Sigatoka negra. Ellos encontraron que la evolución de los síntomas en estos cultivares fue lenta en correspondencia con su respuesta a la enfermedad (parcialmente resistentes) y señalaron que el mecanismo de resistencia de los FHIA a la Sigatoka negra aun se desconoce pero se supone que factores morfológicos y bioquímicos tales como la baja densidad estomática, producción de suberinas o ligninas, el aumento de los depósitos epicuticulares de cera en las hojas, así como la producción de fitoalexinas, pueden ser posibles mecanismos de resistencia parcial en dichos híbridos.

El período de incubación no resultó ser adecuado para diferenciar los cultivares de bananos evaluados ya que fue el mismo para ambos. Este resultado coincidió con los obtenidos por Gauhl (1994) en condiciones de campo.

En inoculaciones artificiales Mourichon *et al.* (1987) determinaron que el período de incubación para plantas *in vitro* de Grande naine, Fougamou y Yangambi km 5 fue de 19 días. Por su parte Mouliom-Pefoura (1995) al inocular plantas provenientes del cultivo *in vitro* de Grande naine con suspensiones conidiales determinó que el período de incubación fue de 17 días.

Las variables tiempo de evolución de los síntomas y tiempo de desarrollo de la enfermedad han sido utilizadas para evaluar genotipos de *Musa* spp. en campo (Mobambo *et al.* 1994; Gauhl *et al.*, 2000) pero poco se han empleado en casas de cultivo con plantas provenientes del cultivo *in vitro*. Molina y Castaño (2003) las usaron para evaluar la resistencia de cultivares FHIA frente a *M. fijiensis* y *M. musicola*

inoculados con suspensiones conidiales de estos patógenos. Estos investigadores obtuvieron tiempos de evolución de los síntomas en FHIA-01 y FHIA-17 superiores a los 55 días para el primer patógeno.

La escala de evaluación cualitativa permitió diferenciar los cultivares Grande naine (susceptible) y FHIA-18 (parcialmente resistente) en casa de cultivo (Tabla 6).

Tabla 4. Concentración de conidios de *P. fijiensis* en tres tiempos de incubación a 20°C.

Medios de cultivo	Concentración de conidios ($\times 10^5$, conidios.ml ⁻¹)			
	10 días	20 días	30 días	Error Estándar
Agar V-8 Modificado	2.29 a	2.16 a	2.50 a	± 0.32
Agar Papa Zanahoria	2.30 a	0.99 c	1.38 b	± 0.15
Agar Papa y Dextrosa	2.52 b	5.91 a	4.98 a	± 0.63

Medias con letras no comunes en una misma fila difieren por Prueba de Dunnett's C para $P < 0.05$.

Tabla 5. Resultado de variables cuantitativas evaluadas en los cultivares Grande naine y FHIA-18 inoculados con *P. fijiensis* (CCIBP-Pf39) en casa de cultivo.

Variabes	Grande Naine	FHIA-18
Periodo de incubación (días)	14	14
Tiempo de evolución de los síntomas (días)	35	>63d*
Tiempo de desarrollo de la enfermedad (días)	49	>63d*

(*) no calculado; no se observaron los síntomas de manchas necróticas con centros secos después de 63 días de la inoculación.

Tabla 6. Estados de los síntomas en los cultivares Grande naine y FHIA-18 (desde los siete hasta los 63 días de inoculados) con suspensiones conidiales de *P. fijiensis*.

Cultivares	Estado de los síntomas*						
	14d	28d	35d	42d	49d	56d	63d
Grande naine	1	2	3	4	5	5	5
FHIA-18	1	1	1	2	2	3	3

*Los datos representan el estado de síntoma predominante en el material vegetal inoculado al momento de la evaluación. d-días después de la inoculación.

En las evaluaciones realizadas se observó que en las hojas inoculadas predominó un mismo estadio de síntoma. Además, se distribuyeron uniformemente sobre toda la superficie foliar. Esto evidenció que el tipo de inóculo (suspensiones conidiales) y el método de inoculación utilizados (aplicación con pincel sobre el envés de la hoja) fueron válidos para la obtención de síntomas de la enfermedad sobre plantas *in vitro* en casa de cultivo. Estos aspectos unidos a las condiciones ambientales donde se mantuvo una humedad relativa por encima del 60% y la temperatura media del día de 27°C sentaron las bases para profundizar en el estudio de la inoculación

artificial con el patógeno como vía para conocer la respuesta de cultivares de *Musa* a la enfermedad.

En la literatura científica sobre el tema cuando se refiere el uso de suspensiones conidiales, generalmente se hace alusión a la concentración de conidios sin tener en cuenta el número de fragmentos de micelio que pueden estar presentes debido al procedimiento por el cual se hayan colectado (Fullerton y Olsen, 1995). Sin embargo, en este estudio el método utilizado para separarlos del micelio (aplicación de Vortex) garantizó que solo se inocularan dichas estructuras de reproducción asexuales.

La calidad y características del inóculo para el desarrollo de estrategias de evaluación temprana de la resistencia de cultivares de plátanos y bananos han sido definidos por el Programa Global para el Mejoramiento de *Musa* (PROMUSA, INIBAP) entre los factores prioritarios que requieren atención e investigación.

CONCLUSIONES

Los conidios de *P. fijiensis* pueden ser obtenidos *in vitro* a 20°C a partir de los 10 días de incubación en los medios de cultivo Agar Papa Zanahoria, Agar V-8 modificado y Agar Papa y Dextrosa, no obstante la mayor concentración de conidios se alcanzó en Agar Papa y Dextrosa a los 20 días de incubación a 20°C.

Fue posible obtener síntomas sobre los cultivares Grande naine y FHIA-18 a partir de la inoculación artificial de suspensiones conidiales de *P. fijiensis* en casa de cultivo.

Mediante el empleo de una escala cualitativa del estado de los síntomas y las variables cuantitativas tiempo de evolución de los síntomas y tiempo de desarrollo de la enfermedad se pudieron diferenciar ambos cultivares que mantuvieron en casa de cultivo una respuesta similar a la observada en campo.

REFERENCIAS

- Alvarado, Y, Leiva M, Rodríguez MA, Acosta M, Cruz M, Portal N, Kosky R, García L, Bermúdez I, Padrón J (2003) Early evaluation of Black leaf streak resistance on *Musa* spp. 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. pp 169-175. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. INIBAP. Montpellier
- Carrier, J, Fouré E, Gauhl F, Jones D, Lepoivre P, Mourichon X, Pasberg-Gauhl C y Romero R (2000) Black Leaf Streak. En: Jones, D (Ed.) Disease of Banana, Abacá and Enset, pp. 37-79. CAB International, Wallingford
- Carrier, J, De Waele D y Escalant JV (2002) Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium* enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos. Guías técnicas INIBAP 6. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, INIBAP. Montpellier
- Ceres, R y Menezes, M (2001) Caracterización patogénica, fisiológica y morfológica de *Pseudocercospora musae*. Fitopatología Brasileña: 26 (2): pp. 3-11
- Cruz, M (2003) 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. UCLV. Fac. Ciencias Agropecuarias. IBP
- Fouré, E (1985) Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains á *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon. Fruits, 40: 393-399
- 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
- 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
- Gaulh, F, Pasberg-Gauhl, C y Jones D (2000) Disease cycle and epidemiology. En: Jones, D (Ed.) Disease of Banana, Abacá and Enset, pp. 56-62. CAB International, Wallingford
- González, M (1999) Metodología para la manipulación y cultivo *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*. Manejo Integrado de Plagas. 53:1-4
- Hanada, R, Gasparotto L y Pereira J (2002) Esporulación de *Mycosphaerella fijiensis* en diferentes medios de cultivo. Fitopatología Brasileña. 27 (2): pp173-179
- Jácome, L y Schuh W (1992) Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Phytopathology 82: 515-520
- Jácome, L y Schuh (1993) Effect of temperature on growth and conidial production *in vitro*, and comparison of infection and aggressiveness *in vivo* among isolates of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Trop. Agric. 70: 51-59
- Leiva, M (1998) Estudio de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet para la diferenciación de genotipos de *Musa* spp. en invernadero. Trabajo de Diploma. UCLV, Santa Clara
- Mata, R, Tapia A, Escalant J (1994) Efecto de la temperatura sobre la germinación de conidios de *Mycosphaerella fijiensis* y *Mycosphaerella musicola*. ACORBAT. Memorias XI reunión San José, pp 287-291. ACORBAT. San José
- Meredith, D S y Lawrence J S (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. Trans. Br. Mycol. Soc. 52 (3): 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
- Molina, O y Castaño, J (2003) Resistencia en los FHIA híbridos a *Mycosphaerella* spp Infomusa 12 (2): 25-27
- Mouliom-Pefoura, A (1995) Les cercosporioses des bananiers et plantains (*Mycosphaerella musicola* Leach et *M fijiensis* Morelet). Epidémiologie et Ecologie dans le contexte des zones de production du Cameroun. Ph.D. Thesis. University of Dschang, Cameroon
- 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
- Pasberg-Gauhl, C, Gauhl F y Jones D (2000) Fungal diseases of foliage. Sigatoka leaf spots. Black leaf streak, distribution and economic importance. En: Jones, D (Ed.) Disease of Banana, Abacá and Enset, pp. 37-44. CAB International, Wallingford
- Romero, RA y Sutton TB (1997) Reaction of four *Musa* genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. Plant Disease 8: 1139-1142
- Williams, B (1990) Efecto de medios de cultivo, temperatura e iluminación sobre la esporulación de *Cercospora fijiensis*. Resúmenes del Congreso Científico Nacional. Panamá. MUSARAMA 4 (2): 25-26