

Caracterización de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet para su utilización en programas de mejoramiento de *Musa* sp.

Mileidy Cruz Martín*, Yelenys Alvarado Capó, Mayra Acosta Suárez, Michel Leiva y 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. e. mail: mcruz@ibp.co.cu, mileidycruz@yahoo.es

RESUMEN

La presente investigación se realizó con los objetivos de: aislar e identificar aislados de *Pseudocercospora fijiensis* de diferentes localidades de las provincias de Villa Clara y de Ciego de Ávila, caracterizarlos cultural, morfológica y fisiológicamente así como evaluar su patogenicidad y virulencia sobre cuatro cultivares de *Musa*. Para su caracterización se evaluó el crecimiento en medios de cultivo sólido y líquido, se caracterizaron las estructuras de reproducción asexual, se evaluó el efecto del número de subcultivos sobre la producción de conidios y se determinó la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de la Higromicina B y el Carbendazim frente a estos. Se obtuvieron aislados cuyas características culturales y morfológicas coincidieron con las referidas en la literatura científica para esta especie. Además, se comprobó que la producción de conidios *in vitro* disminuyó con el incremento del número de subcultivos y que esta fue independiente del aislado. Fue posible determinar la MCI de sustancias antimicrobianas al utilizar como inóculo suspensiones miceliales. Se comprobó la patogenicidad de aislados de *P. fijiensis* sobre genotipos de *Musa* y se encontraron diferencias en cuanto a su virulencia. Los resultados alcanzados en este trabajo confirman lo planteado por otros autores cuando se refieren a la alta variabilidad a la que es sujeta *M. fijiensis* debido a su reproducción sexual y por ende la necesidad de su estudio para lograr estrategias efectivas para el mejoramiento de plantas con resistencia a este patógeno.

Palabras clave: conidios, *Mycosphaerella fijiensis*, patogenicidad, subcultivos

ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objectives of isolating and identifying *Pseudocercospora fijiensis* isolates of different regions of Villa Clara and Ciego de Ávila provinces, to characterize them culturally, morphologically and physiologically as well as to evaluate their pathogenicity and virulence on *Musa* cultivars. The growth in solid and liquid cultures media was evaluated, the structures of asexual reproduction were characterized and the subculture number effect on the conidia production was determined, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Higromicin B and Carbendazim was determined in front of these. *P. fijiensis* isolates were obtained and their cultural and morphological characteristic coincided with those referred in the scientific literature for this specie. It was also proven, that the *in vitro* conidia production diminished with the increment of the subcultures number and that it was independent of the isolates. It was possible to determine the MIC of Higromicin B and Carbendazim with the agar dilution method using mycelia suspensions as inoculums. It was demonstrated their pathogenicity on *Musa* genotypes artificially inoculated with mycelia suspensions and there were differences in respect their virulence. The obtained results evidenced the variability of the *M. fijiensis* by their sexual reproduction and the necessity of their study to find effective strategies for the plants improvement.

Key words: conidia, *Mycosphaerella fijiensis*, pathogenicity, subculturing

La raya negra de la hoja o Sigatoka Negra, causada por el ascomicete *Pseudocercospora fijiensis*, es la enfermedad más importante que ataca la superficie foliar de los plátanos y bananos. Las necesidades actuales de investigación están encaminadas a desarrollar un enfoque hacia el estudio y modelación de la epifitología, distribución y estructura del patógeno a escalas nacionales, regionales e internacionales. Todo ello contribuirá a incrementar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético de bananos y plátanos encaminados a lograr la resistencia duradera a Sigatoka negra. Considerando la importancia de disponer de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* caracterizados para evaluar la resistencia en condiciones controladas (por

inoculación artificial) de genotipos promisorios de *Musa* se definieron como objetivos: aislar e identificar aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet de diferentes localidades de las provincias de Villa Clara y de Ciego de Ávila, caracterizarlos cultural, morfológica y fisiológicamente así como evaluar su patogenicidad y virulencia sobre cuatro cultivares de *Musa*.

El aislamiento de *P. fijiensis* se realizó de acuerdo con el método de descarga de ascospora propuesto por Stover (1976) a partir de hojas enfermas en estado 6 (según la escala propuesta por Fouré, 1982) del cultivar de Grande naine (AAA, subgrupo *Cavendish*) dentro de la provincia de Villa Clara y de la provincia de Ciego de Ávila. Se lograron obtener nueve aislados

de *P. fijiensis* procedentes de pequeñas parcelas de Santa Clara, Vueltas, Santo Domingo, Remedios en la Estación experimental "Pedro Lantigua" y de Ciego de Ávila procedentes de la Empresa de cultivos varios "La Cuba". Las características de las ascosporas obtenidas, coincidieron con las referidas para este patógeno por Leach (1964). Además, se pudo comprobar la presencia del *hilum* basal en los conidios producidos y las características de estos coincidieron con las referidas en la literatura para esta especie (Meredith y Lawrence, 1969; Carlier *et al.*, 2002).

Como parte de la caracterización cultural se evaluó el crecimiento de los aislados en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) acorde a lo referido por Meredith y Lawrence (1969) y se describieron las características culturales de cada uno en el mismo. También se evaluó el crecimiento en medio de cultivo líquido M1-D utilizado tradicionalmente para la producción de metabolitos fitotóxicos de este patógeno. Las características de las colonias en PDA coincidieron con las referidas en la literatura para esta especie (micelio superficial, aterciopelado, elevado, compacto y micelio estromático negro). En todos los casos crecieron colonias de forma convexa, circulares y con bordes regulares. El crecimiento lento fue típico para todos los aislados, en correspondencia con lo planteado por varios autores (Meredith y Lawrence, 1969; Manzo *et al.*, 2001) y el diámetro de las colonias después de 14 días no fue superior a 6mm. No obstante, se encontraron diferencias significativas entre aislados con respecto al diámetro de las colonias. En cuanto al crecimiento de los aislados en medio de cultivo M1-D no se encontraron diferencias en las características culturales del micelio (coloración, textura,

pigmentación del medio) y sí, en lo referido al crecimiento (peso seco). Este varió entre los aislados independientemente de la localidades de donde procedían (Figura 1).

En cuanto a los valores de pH no se verificaron diferencias estadísticas entre aislados. Sin embargo, es de destacar que de forma general, el peso seco y el pH, se comportaron como variables inversamente proporcionales. Este resultado puede ser indicativo de que el desarrollo del micelio en estas condiciones de cultivo, esté relacionado directamente con el consumo o degradación de componentes del medio de cultivo que provoquen una disminución del pH.

Para caracterizar morfológicamente las estructuras de reproducción asexual de los aislados obtenidos de *P. fijiensis* se inocularon suspensiones miceliales de los diferentes aislados en medio de cultivo V-8 y se incubaron durante 25 días a 20 °C en presencia de luz fluorescente (60 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Los conidios presentaron color verde pálido a oliváceo, obclavados a cilindro-obclavados, septados, rectos o curvos con presencia de *hilum* basal distintivo. A pesar de que los valores medios de la longitud de los conidios y conidióforos coincidieron con los descritos por la literatura se encontraron dimensiones mayores (Tabla 1). Estos resultados estuvieron en concordancia con lo planteado por Meredith y Lawrence (1969) quienes refirieron que los conidios producidos *in vitro* tienden a presentar dimensiones mayores que aquellos obtenidos en condiciones naturales. Se pudo observar una gran variabilidad entre aislados en cuanto a la longitud de los conidios. Esta se manifestó independientemente del lugar de procedencia ya que aislados de una misma localidad difirieron estadísticamente.

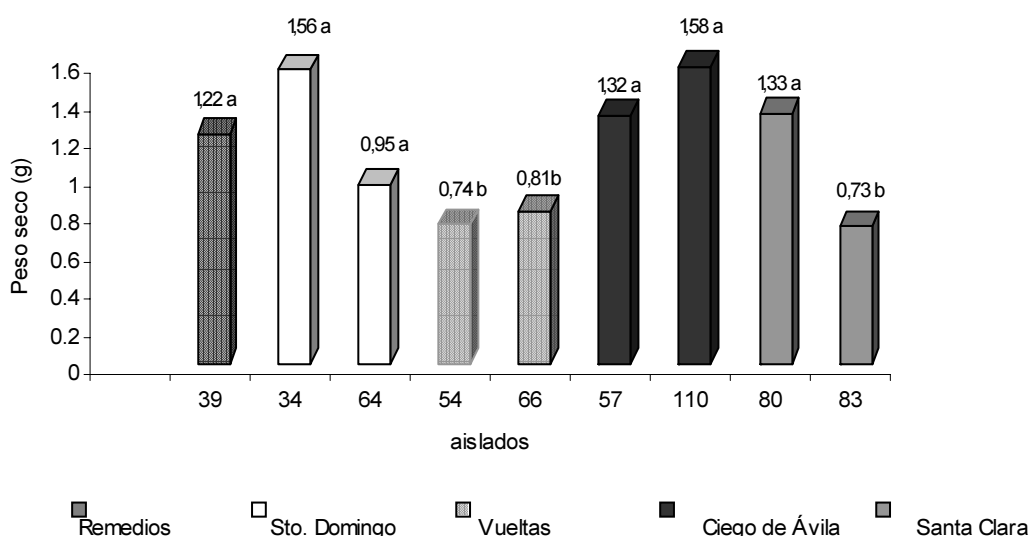


Figura 1. Peso seco (g) micelio de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* crecidos durante 40 días a 28° C, en condiciones estáticas y oscuridad constante en medio de cultivo M1-D. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente según Dunnett's C con $P= 0.05$

Tabla 1. Longitud y número de septos de conidios y conidióforos de aislados de *P. fijiensis* en medio de cultivo V-8 después de 25 días de incubación.

Aislado	Conidios		Conidióforos	
	Media (µm)	No. septos	Media(µm)	No. septos
CCIBP- Pf39 ¹	82.01 cd	5.47 c	51.16 b	3.8 a
CCIBP- Pf34 ²	85.37 bcd	5.90 bc	47.84 ab	2.8 a
CCIBP- Pf64 ²	93.89 bc	5.47 c	52.95 b	2.4 b
CCIBP-Pf 54 ³	67.54 e	5.19 c	49.93 b	2.7 a
CCIBP-Pf66 ³	109.54 a	6.00 bc	55.34 ab	1.7 b
CCIBP-Pf57 ⁴	83.20 cd	5.66 c	56.58 b	2.2 b
CCIBP-Pf110 ⁴	99.04 ab	5.85 bc	47.84 ab	3.1 a
CCIBP-Pf80 ⁵	87.16 bcd	6.71 a	66.14 a	4.6 a
CCIBP-Pf83 ⁵	76.86 de	5.33 c	67.39 b	2.5 a
E.E	± 6.82	± 0.32	± 0.46	± 0.47

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según Dunnett's C para $P= 0.05$. ¹ Remedios, ² Sto. Domingo, ³ Vueltas, ⁴ Ciego de Ávila, ⁵ Santa Clara

Al evaluar el efecto del número de subcultivos sobre la esporulación de *Pseudocercospora fijiensis* se encontraron diferencias significativas en el número de conidios producidos entre aislados con diferentes números de subcultivos *in vitro*. A medida que se incrementó el número de subcultivos, disminuyó la producción de conidios. El número de subcultivos *in vitro* influyó negativamente en la cantidad de conidios producidos por *P. fijiensis* y fue independiente de los aislados evaluados. En los programas de mejoramiento de *Musa* spp. donde se empleen metodologías de selección temprana de genotipos con resistencia a Sigatoka negra y se utilicen los conidios como fuente de inóculo es imprescindible contar con aislados del patógeno que mantengan la capacidad de producirlos *in vitro* por lo que estos necesitan ser conservados y no incrementarse en más de cuatro el número de subcultivos *in vitro*.

Como parte de la caracterización fisiológica se determinó la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de la Higromicina B y el Carbendazim de los aislados medio de cultivo PDA por el método de dilución en agar y se emplearon como inóculo suspensiones miceliales. La MCI de Higromicina B para el 66.6% de los aislados fue de 4 µg.ml⁻¹ y para el 100% de los aislados se halló en valores menores e iguales a 8 µg.ml⁻¹. Las MCI del carbendazim para el 90% de los aislados se encontraron en valores menores e iguales a 0.125 µg.ml⁻¹. Sin embargo, el aislado de Ciego de Ávila (CCIBP-Pf57) no pudo ser inhibido a las concentraciones ensayadas. Un aspecto a destacar en los resultados es que los aislados CCIBP-Pf57 y CCIBP-Pf110 aún teniendo un mismo origen geográfico ("La Cuba" en Ciego de Ávila) mostraron respuestas diferenciales en cuanto a susceptibilidad al carbendazim. Esto concuerda con

lo planteado por Marín *et al.* (2003) quienes refieren la persistencia de aislados individuales resistentes a benzimidazoles dentro de las poblaciones de *P. fijiensis*.

La determinación de la MCI utilizando suspensiones miceliales como inóculo y no discos de micelio, permitió minimizar la dificultad que representa el crecimiento extremadamente lento de este patógeno en medios de cultivo sólido. Además, constituye una alternativa al uso de conidios como inóculo.

Al evaluar la patogenicidad y virulencia de cuatro de los aislados de *P. fijiensis* sobre cultivares de *Musa*, se demostró su patogenicidad y la posibilidad de usarlos en programas de mejoramiento genético de *Musa* para la resistencia a *P. fijiensis*. Se pudo constatar, además, diferencias entre los aislados en cuanto a su virulencia sobre los cultivares susceptibles y que esta no estuvo relacionada con el origen de aislamiento de los mismos. Los resultados alcanzados en este trabajo confirman lo planteado por otros autores cuando se refieren a la alta variabilidad a la que es sujeta *M. fijiensis* debido a su reproducción sexual y por ende la necesidad de su estudio para lograr estrategias efectivas para el mejoramiento de plantas con resistencia a este patógeno.

REFERENCIAS

Carlier, J, De Waele D y Escalant JV (2002) Global evaluation of *Musa* germplasm for resistance to *Fusarium* wilt, *Mycosphaerella* leaf spot diseases and nematodes. (A Vézina y C. Picq, eds). INIBAP Technical Guidelines 6. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, INIBAP, Montpellier

- Fouré, E (1982) Les Cercosporiose du bananier et leur traitement. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité varietale des bananiers et plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladies de raies noires). I Incubation et evolution de la maladie. II Etude de quelques parametres. Fruits 37 (12) : 749-754
- Leach, R (1964) Report on investigations into the cause and control of the new banana disease in Fiji, black leaf streak. Coun. Pap. Fiji. No. 38
- Manzo, G, Orozco M y Guzmán S (2001) Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios de cultivo líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología 2: 66-71
- Marín, D, Romero R, Guzmán M y Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. Plant disease 87(3): 208-222
- Meredith D.S y 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. Trans. Br. Mycol. Soc. 52 (3): 459-476
- Stover, R (1976) Distribution and cultural characteristics of the pathogen causing banana leaf spot. Tropical Agriculture (Trinidad) 53: 111-114.