

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*

Idalmis Bermúdez-Carabaloso*, Michel Leiva-Mora, Yelenys Alvarado-Capó, Lourdes R. García, Novisel Veitía, Mayra Acosta-Suárez. * Autor para correspondencia.

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

RESUMEN

El desarrollo de metodologías que permitan evaluar grandes volúmenes de plantas y detectar de forma temprana y rápida los caracteres buscados facilita en gran medida los trabajos de selección en los Programas de Mejoramiento Genético de bananos y plátanos. Se emplearon para los estudios cinco mutantes del cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), tratados con agentes mutagénicos físicos (radiaciones gamma, fuente ^{60}Co), los que habían sido seleccionados anteriormente en el campo por su baja altura. Como controles se utilizaron los cultivares 'Grande naine' (*Musa AAA*) susceptible, 'FHIA-20' (*Musa AAAB*) como resistente así como 'FHIA-21' sin irradiar. Estos se multiplicaron *in vitro* y se aclimatizaron durante 60 días. Las plantas fueron inoculadas con un homogeneizado micelial de *Mycosphaerella fijiensis* con una concentración de 1×10^5 fragmento de micelio. ml^{-1} mediante un pincel por el envés de las cuatro primeras hojas abiertas. Se evaluaron a los 15, 30, 45 y 60 días los grados de afectación causados por el patógeno. Los primeros síntomas aparecieron a los quince días de inoculadas las plantas. El mutante 'IBP 14-23' presentó los valores más bajos del grado de afectación al compararlo con el resto de los mutantes.

Palabras clave: evaluación temprana, mutagénesis *in vitro*, Sigatoka negra

ABSTRACT

The development of methodologies that allow to evaluate great volumes of plants and to detect in an early and fast way the searched characters facilitates greatly the works of selection in the Breeding Programs of banana and plantains. Five mutants of plantain hybrid 'FHIA-21' (*Musa AAAB*), treated with physical mutagenic agents (Gamma radiations, ^{60}Co source), those that had been selected previously in the field by their low height were used for the studies. 'Grande naine' (*Musa AAA*) susceptible, 'FHIA-20' (*Musa AAAB*) as resistant and 'FHIA-21' without irradiation were used as controls. They were multiplied *in vitro* and acclimatized for (60 days). The plants were inoculated with mycelia suspensions of *Mycosphaerella fijiensis* at a concentration of 1×10^5 . ml^{-1} by means of a brush by abaxial leaf surface of the four first open leaves. Affectation degrees caused by the pathogen were evaluated after 15, 30, 45 and 60 days plants had been inoculation. The first symptoms appeared in the cultivar 'Grande naine' to the 45 days plants had been inoculated. Mutant 'IBP 14-23' stood out with the lowest values of affectation to the damages caused by *Mycosphaerella fijiensis*, when compared to the rest of mutants studied, corroborating its behavior in field.

Key words: Black Sigatoka, earlier detection, *In vitro* mutagenesis

INTRODUCCIÓN

La enfermedad Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es la más nociva presente en las plantaciones de Musáceas a nivel internacional y en Cuba. Cuatro años después de su aparición en 1990, reemplazó a la Sigatoka amarilla (*M. musicola*) en todas las áreas del país. Esta enfermedad ha tenido un serio impacto en la producción de plátanos susceptibles. En 1989, existían más de 40 000 hectáreas de plátanos (*Musa* cv. AAB) y 14 000 hectáreas de bananos Cavendish (*Musa* cv. AAA) bajo protección fúngica. A finales de 1995 se habían reducido en un 69 y 51 % respectivamente (Pérez *et al.*, 2002).

La principal vía de solución para reducir los daños ocasionados por esta enfermedad es la búsqueda de variedades resistentes. Varios híbridos, especialmente los provenientes del Programa de Mejoramiento de la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), se han venido evaluando en diferentes regiones del mundo (Rowe y Rosales, 1993). Sobresale entre ellos el híbrido de plátano 'FHIA-21' de buen rendimiento y respuesta frente a la Sigatoka negra. En el caso de Cuba se han informado niveles de afectación por Sigatoka negra en todas las hojas funcionales de la planta de este híbrido, en el momento de la cosecha, lo cual en condiciones extremas de infección tiene incidencia sobre el rendimiento (Orellana *et al.*, 2002).

En los últimos años, se han desarrollado importantes herramientas para el mejoramiento genético de los cultivos de *Musa*, a través del uso de técnicas biotecnológicas entre las que se destacan: la mutagénesis *in vitro* y la transformación genética de plantas (Kosky, 1998).

No obstante, no se debe dejar pasar por alto que estas técnicas deben ir acompañadas de metodologías de selección eficientes y reproducibles para lograr mayores posibilidades de seleccionar individuos con los caracteres mejorados (Bakry y Horry 1994, Roux *et al.* 1994). La obtención de nuevos genotipos resistentes a la Sigatoka negra continúa siendo una prioridad (Nichterlein, 2000).

La utilización de estas técnicas biotecnológicas, para la obtención de variedades resistentes, tiene como inconveniente que es necesario trabajar con un número elevado de individuos en las evaluaciones en condiciones de campo, lo que dificulta el trabajo de selección y resulta costoso, por lo que se hace necesario desarrollar metodologías que permitan evaluar grandes cantidades de plantas y detectar en forma rápida y temprana los caracteres buscados.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta frente a la enfermedad Sigatoka negra, de cinco mutantes de bajo porte en el cultivar híbrido de plátano 'FHIA-21', en condiciones de casas de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos evaluados

Se evaluaron cinco mutantes seleccionados de 'FHIA-21' (*Musa* AAAB) ('IBP 14-23', 'IBP 17-13', 'IBP 24-14', 'IBP 50-5', 'IBP 47-4') obtenidos por mutagénesis física con radiaciones gamma, fuente ⁶⁰Co a una dosis de 25 Gy (Bermúdez-Carballoso *et al.*, 2000). Como controles se utilizaron los cultivares 'Grande naine' (*Musa* AAA) como susceptible, 'FHIA-20' (*Musa* AAAB) como resistente y 'FHIA-21' sin irradiar.

Obtención del material vegetal

Para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro*, se siguió el procedimiento que describió Orellana (1995). Luego de cinco subcultivos fueron enraizadas las plantas y a los 21 días fueron llevadas a la fase de aclimatización.

Aclimatización

Se realizó en condiciones ambientales con la luminosidad reducida de 60-70% mediante una malla o zarán. Las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* se plantaron en cajas de polietileno de 70 orificios, que contenían sustrato estéril compuesto por la mezcla

7:3 de zeolita y casting. Se realizó una fertilización por semana con urea foliar al 2%. El riego se realizó por microaspersión tres veces al día con una duración de 10 minutos cada vez. A los 45 días fueron transplantadas a bolsas. Las plantas que se tomaron para inocular tenían una altura promedio de 20 centímetros y no menos de cuatro hojas fotosintéticamente activas.

Evaluación de los mutantes inoculados con la suspensión micelial de *Mycosphaerella fijiensis*

La preparación del inóculo, la inoculación y la evaluación de *Mycosphaerella fijiensis* se realizó según la metodología propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003). La suspensión micelial, tenía una concentración de 1×10^5 fragmentos de micelio. ml⁻¹, mezclado con gelatina al 1% la cual se aplicó al material vegetal con la ayuda de un pincel. Se inocularon por el envés las cuatro primeras hojas. Las plantas inoculadas fueron mantenidas con humedad relativa del 95% al 100% las primeras 72 horas por nebulización de agua continua. A partir del cuarto día la humedad relativa durante el día se mantuvo por encima del 50%, mientras que por la noche fue saturante (100%).

Evaluaciones realizadas

A partir de los quince días de la inoculación (dpi) se comenzaron a realizar las evaluaciones, y se continuaron a los 30, 45 y 60. Para las evaluaciones se empleó la escala propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003) (Tabla 1).

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 15 plantas por cada mutante de 'FHIA-21' así como los controles utilizados. Para la variable grados de afectación se aplicó la prueba no paramétrica (Pruebas de Kruskal-Wallis), complementándose con una comparación múltiple no paramétrica de medias de rango. Se empleó el paquete de programas STATISTIX ver. 1.0 sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de los mutantes inoculados con la suspensión micelial de *Mycosphaerella fijiensis*

En las cuatro evaluaciones realizadas a los 15, 30, 45 y 60 (dpi), los mutantes ('IBP 17-13', 'IBP 50-5', 'IBP 47-4', 'IBP 14-23' e 'IBP 24-14') mantuvieron un comportamiento similar con el 'FHIA-21' sin irradiar (0.67) y el 'FHIA-20' utilizados como controles resistente (0.67). El mutante 'IBP 14-23' a los 45 (dpi) mostró diferencias significativas con los valores más bajos de afectación (0.2) con respecto al 'Grande naine' (2.8) utilizado como control susceptible (Tabla 2).

Tabla 1. Descripción de los grados de afectación desarrollados en plantas de *Musa* sp. inoculadas con una suspensión micelial de *Mycosphaerella fijiensis* en casa de cultivo de acuerdo con Alvarado-Capó *et al.* (2003)

Grado de afectación	Descripción
0	Predominio de hojas sanas.
1	Predominio de hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojizas.
2	Predominio de hojas con manchas de contornos irregulares o regulares de coloración rojiza por el envés de las hojas.
3	Predominio de hojas con manchas de contornos irregulares o regulares de coloración pardo-rojiza por el haz.
4	Predominio de hojas con manchas negras (elípticas o circulares), con bordes cloróticos y halo acuoso y la presencia de sectores verdes.
5	Predominio de hojas con manchas negras con centros grises, las hojas pueden colgar del pseudotallo.

Tabla 2. Grados de afectación provocados por el homogeneizado micelial de *Mycosphaerella fijiensis* en los mutantes de FHIA-21 y los cultivares controles inoculados artificialmente en casa de cultivo.

Genotipos	45 (dpi)		60 (dpi)	
	Media real	Media de Rango	Media Real	Media de Rango
IBP 50-5	1.8	68.87 ab	2.67	72.96 ab
IBP 24-14	2.27	74.47 ab	2.6	69.07 ab
IBP 17-13	1.6	71.10 ab	2.13	62.33 ab
IBP 14-23	0.2	26.40 c	0.93	34.70 b
IBP 47-4	1.93	67.80 ab	2.53	66.27 ab
Grande naine	2.8	91.97 a	3.93	96.77 a
FHIA-21	0.67	42.10 bc	1.27	42.60 b
FHIA-20	0.67	41.30 bc	1.13	39.30 b

Medias de rango con letras no comunes en una misma columna difieren por prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis para $p < 0.05$.

En las evaluaciones a los 60 días todos los mutantes mantuvieron un comportamiento superior al cultivar susceptible en cuanto al grado de afectación (3.93) pero sin diferencias significativas. Solo el mutante 'IBP 14-23' difirió estadísticamente del control de 'Grande naine' y los controles resistentes 'FHIA-21' y 'FHIA-20' (1.27 y 1.13) respectivamente.

Esta respuesta diferente entre los mutantes se puede atribuir a que muchas veces las plantas obtenidas con el empleo de la mutagénesis *in vitro* no llegan a tener valor comercial (Remotti, 1998) ya que las variaciones que surgen con el cultivo de células pueden ser debido a variaciones epigenéticas, las cuales no son transmitidas a los regenerantes y sus progenies (Jain *et al.*, 1998). Para el caso de los mutantes ('IBP 17-13', 'IBP 50-5', 'IBP 47-4' e 'IBP 24-14') se logró reducir su altura pero no fue posible cambiar su respuesta a

la enfermedad sino que se mantuvieron de igual modo que la variedad donante en este caso el 'FHIA-21', esto resulta en extremo difícil si se tiene en cuenta que ambos caracteres están determinados poligénicamente.

Varios autores han logrado establecer diferencias entre cultivares, en cuanto a su respuesta a la Sigatoka negra en evaluaciones tempranas; entre ellos Mourichon *et al.* (1987) quienes realizaron inoculaciones, utilizando conidios, en hojas de plantas de tres cultivares diferentes, los cuales presentaban diferente sensibilidad al hongo y lograron a partir de los 38 días de iniciado el experimento encontrar diferencias entre los cultivares estudiados.

Leiva-Mora *et al.* (2002) usando esta metodología de selección precoz lograron diferenciar genotipos susceptibles ('Grande naine') de los resistentes

('FHIA-18') a la Sigatoka negra, por lo que sin dudas es una herramienta muy útil para el mejoramiento genético a esta enfermedad, ya que permite aumentar de forma significativa la eficiencia de la selección.

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se determinó que es posible evaluar en casas de cultivo plantas obtenidas por mutagénesis con respecto a su respuesta a la enfermedad Sigatoka negra, ya que en el caso específico del mutante 'IBP 14-23' se manifestó de forma muy similar a como lo hizo en condiciones de campo en evaluaciones realizadas anteriormente (Bermúdez-Caraballosa *et al.*, 2000).

REFERENCIAS

- Alvarado-Capó Y, Leiva-Mora M, Dita M, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Portal N, Kosky RG, García LR, Bermúdez I (2003) Early evaluation of Black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Jacome L, Lepoivre P, Marin D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (Eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook., pp. 169-175. INIBAP. Montpellier
- Bakry, F, Horry J (1994) *Musa* Breeding at Cirad – Flhor. En: Jones, DR (Ed). The improvement and Testing of *Musa*: a Global partnership Proceedings of the First Global Conference of the International *Musa* Testing Program held at FHIA, pp. 169-176. Honduras
- Bermúdez-Caraballosa, I, Orellana P, Pérez JN, Clavero JG, Veitia N, Romero CQ, García LR (2000) Mejoramiento del clon híbrido de plátano FHIA-21 con el uso de la mutagénesis *in vitro*. InfoMusa 9: 6-19
- 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 nemátodos. Guías Técnicas de INIBAP. 6: 15-20
- Fouré, E (1982) Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. I. Incubation et evolution de maladie. Fruits 37: 749-759
- Kosky, R (1998) Cultivo de Células y Tejidos. En: Pérez JN (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 25-44. IBP, Santa Clara
- Jain, S, Brar D, Ahloowalia B (1998) Somaclonal variation. Mechanism and Applications in Crop Improvement. En: Jain, MS, Brar DS, Ahloowalia BS (Eds). Somaclonal variation and induced mutations crop improvement, pp. 15-32. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Leiva, M, Dita MA, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, García LR, Bermúdez I (2002) Empleo de diferentes inóculos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de invernadero para evaluar el comportamiento de dos cultivares de banano. InfoMusa. 11: 41-42
- Mourichon, X, Peter D, Zapater M (1987) Inoculation experimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur jeunes plantules de bananier issue de culture *in vitro*. Fruits 45: 195-198
- Murashige, T, Skoog T (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 5:473-497
- Nichterlein K (2000) Workshop on Mutation and *in vitro* culture techniques for the improvement of vegetatively propagated tropical food crops. Curso FAO/IAEA/UCR. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. pp. 56
- Orellana PP (1995) 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. pp 120
- Orellana PP, Bermúdez-Caraballosa I, G Rodríguez L, Veitia N (2002) Evaluación de características agronómicas en clones híbridos de plátanos (*Musa* spp.). InfoMusa 11: 34-35
- Pérez LV, Álvarez JM, Pérez M (2002) Economic impact and management of Black leaf streak disease in Cuba. En: Jacome L, Lepoivre P, Marin D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (Eds). *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook. pp. 71-85. INIBAP. Montpellier
- Remotti, P (1998) Somaclonal Variation and *In vitro* Selection for Crop Improvement. En: Mohan Jain S, Brar DS y Ahloowalia BS (Eds). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, pp. 169-201. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Roux, N, Afza R, Brunner H, Morpurgo R, van Duren M (1994) Complementary Approaches to Cross-Breeding and Mutation Breeding for *Musa* Improvement. En: Jones, Dr (Ed). The improvement and Testing of *Musa* a Global Partnership. Proceedings of the First Global Conference of the International *Musa* Testing Program held at FHIA, Honduras 27-30 abril, pp. 213-218. INIBAP. Montpellier
- Rowe, PR, Rosales F (1993) Genetic improvement of bananas, plantains and cooking bananas in FHIA. En: Ganry, J (Ed.). Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests: proceedings of an international symposium organized by CIRAD-FLHOR. pp. 243-266. CIRAD in collaboration with INIBAP, Montpellier