

MÉTODO RÁPIDO DE DIAGNÓSTICO DE *MYCOSPHAERELLA MUSICOLA* LEACH Y *M. FIJIENSIS* MORELET, AGENTES CAUSANTES DE LAS SIGATOKAS AMARILLA Y NEGRA

por

Martha Cecilia Aguirre Gaviria¹, Jairo Castaño-Zapata²
& Luis Eduardo Zuluaga³

Resumen

Aguirre Gaviria M.C., J. Castaño-Zapata & L. E. Zuluaga: Método rápido de diagnóstico de *Mycosphaerella musicola* Leach y *M. fijiensis* Morelet, agentes causantes de las sigatokas amarilla y negra. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **27** (105): 619-623, 2003. ISSN 0370-3908.

Los peritecios de *Mycosphaerella musicola* y *M. fijiensis*, son similares. Ambos hongos se diferencian principalmente por la morfología de sus anamorfos. Esta investigación tuvo como objetivo establecer una metodología que permitiera el diagnóstico rápido de *M. musicola* y *M. fijiensis*. El método consiste en utilizar jeringas de plástico de 6 cm³, a las cuales se les remueve el extremo anterior. Los dispensadores se llenan con agar-cristal violeta más estreptomycin y benomyl. De cada jeringa se pueden obtener entre 20 y 24 discos. El cristal violeta permite diferenciar a las dos especies, por teñir los conidios, siendo la coloración más intensa en el hilio, presente en *Paracercospora fijiensis* y ausente en *Pseudocercospora musae*, anamorfos de *M. fijiensis* y *M. musicola*, respectivamente.

Palabras clave: Sigatokas, *Mycosphaerella fijiensis*, *M. musicola*, *Paracercospora fijiensis*, *Pseudocercospora musae*.

Abstract

The sexual states of *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* are similar. Both species are mainly differentiated by morphological characteristics of their anamorphs. This research had as main objective to establish a simple methodology to allow the rapid diagnosis of *M. musicola* and *M.*

¹ Corpoica, Nataima, Ibagué. M.Sc.

² Ph.D. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. fedecast42@hotmail.com

³ Corpoica, Regional 9 Manizales. Auxiliar de Investigación.

fijiensis. The method consists in using disposable syringes of 6 cm³, from which are removed the front extreme to obtain cylinders. These are filled with agar-crystal violet plus streptomycin and benomyl. The use of crystal violet allows to differentiate both species, dyeing the conidia, being the coloration more intensive at the scar (hilum) or point of attachment of the conidia to the conidiophores, present in *Paracercospora fijiensis* and absent in *Pseudocercospora musae*, anamorphs of *M. fijiensis* and *musicola*, respectively.

Key words: Sigatoka, *Mycosphaerella fijiensis* *M. musicola*, *Paracercospora fijiensis*, *Pseudocercospora musae*.

Introducción

Mycosphaerella musicola Leach [anamorfo *Pseudocercospora musae* (A. Zimmerm) Deighton, sin. *Cercospora musae* A. Zimmerm.] y *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (sin. *M. fijiensis* var. *difformis* Mulder & Stover) [anamorfo *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, sin. *Cercospora fijiensis* Morelet y *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton], son los agentes causantes de las sigatocas amarilla y negra de las musáceas, respectivamente (Fullerton, 1994).

La sigatoka amarilla, conocida previamente como enfermedad sigatoka toma su nombre del valle Sigatoka, Isla de Viti Levu, Fiji, en donde la enfermedad se reconoció por primera vez en 1902. En 1912, ocasionó grandes pérdidas en Fiji, principalmente en el valle de Sigatoka, de donde derivó su nombre. Otros registros sobre daños causados a la industria bananera por esta enfermedad han sido en 1924 en Australia; en la década de 1930-1940 en Centro América, islas del Caribe y Sudamérica; como también en África (Mourichon & Fullerton, 1990). Posteriormente se registró su presencia en casi la totalidad de las regiones productoras de musáceas del mundo y ha sido considerada como una de las enfermedades más devastadoras del cultivo.

La sigatoka negra, se describió como una enfermedad nueva en 1963, también en Fiji (Rhodes, 1964; Leach, 1964), aunque hay evidencias de su presencia en Hawai y en algunas zonas del Pacífico desde mucho antes (Stover, 1972). En Centroamérica se describió por primera vez en Honduras en 1972 y desde allí se diseminó por el resto de la región. En Sudamérica se registró por primera vez en Colombia en 1981, posteriormente en Ecuador en 1989 y más recientemente en Cuba y Venezuela (Mourichon & Fullerton, 1990).

Aunque a nivel macroscópico los síntomas ocasionados por ambas enfermedades en el campo pueden indicar diferencias, éstas no son suficientemente nítidas para distinguir con precisión ambas sigatocas (Du Pont, 1980). A

nivel microscópico, los peritecios del estado sexual de *M. musicola* y *M. fijiensis* son muy parecidos y se localizan inmersos en el tejido necrosado de las lesiones, midiendo aproximadamente 51-86 x 35-77 μ. El estado asexual de *M. musicola* forma estromas (esporodoquios) tanto en la haz como en el envés de las hojas, siendo más abundantes sobre la haz y los conidios, y sin cicatriz (hilio) en el punto de unión con el esporodoquio; mientras que el estado asexual de *M. fijiensis* produce conidióforos simples con cicatriz, tanto en la base de los conidios como en los conidióforos (Castaño-Zapata & del Río, 1994). En ambas especies los conidios son alargados, septados, hialinos y aciculares. De acuerdo con lo anterior, los estados sexuales de *M. musicola* y *M. fijiensis* son indistinguibles. Ambos microorganismos se distinguen principalmente a través de diferencias morfológicas de sus anamorfos, en particular las características de los conidióforos y conidios, específicamente por la presencia de cicatrices en los conidióforos y conidios de *M. fijiensis*, ausentes en *M. musicola* (Fullerton, 1994). La abundancia de estromas y conidios de *P. fijiensis* en la parte inferior de las lesiones y de *P. musae* en la parte superior, también sirve como guía rápida para la identificación de estas especies (Fullerton, 1994). Por consiguiente, la identificación correcta de estos hongos depende de estudios de laboratorio.

Esta investigación tuvo como objetivo principal establecer una metodología simple que permitiera el diagnóstico rápido de *M. musicola* y *M. fijiensis* bajo condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

El método es una modificación de la técnica empleada por Lalancett *et al.* (1984) y consiste en utilizar jeringas de plástico desechables de 6 cm³, marca Precision Glide 21G 1 1/2 o similares, a las cuales se les remueve el extremo anterior para utilizarlas como cilindros cuya área de la abertura es de 123.7 mm². Los dispensadores se llenan con agar-cristal violeta más estreptomycin y benomyl (Agar bacteriológico Oxoid 1.5 g, estreptomycin en dis-

cos Oxoid 10 ug, benomyl 100 ppm, solución pura de cristal violeta al 1%, agua 100 mL). La estreptomycin, el benomyl y el cristal violeta se añaden al medio líquido previamente esterilizado a 121°C y 15 lb de presión durante 20 min, antes de dispensar el medio en las jeringas. Una vez llenas, se colocan en posición vertical en una gradilla, la cual se coloca a 4°C en un refrigerador para que el medio se solidifique rápidamente.

Para remover en el campo los conidios de *Pseudocercospora musae* o *Paracercospora fijiensis* se presiona el émbolo de la jeringa hasta que quede a libre exposición, aproximadamente 2 mm en espesor de medio (Figura 1A). La superficie húmeda del agar-cristal violeta se presiona suavemente sobre un área necrosada de la hoja

más joven (Figura 1B). Luego el disco de agar-cristal violeta se corta cuidadosamente con un bisturí de tal manera que forme una superficie lisa (Figura 1C). Se colocan dos discos por lámina portaobjetos, las cuales se van depositando dentro de una bandeja con tapa, la cual contiene papel toalla humedecido con el propósito de crear una cámara húmeda para inducir la difusión rápida del colorante a través de las células de los conidios del muestreo y evitar la deshidratación del medio (Figura 1D). De cada jeringa se pueden obtener 20-24 discos, suficientes para obtener 10-12 muestras replicadas dos veces.

Utilizando esta metodología el investigador establece una correspondencia entre el número de discos y el número de lesiones analizadas, así como entre el número de



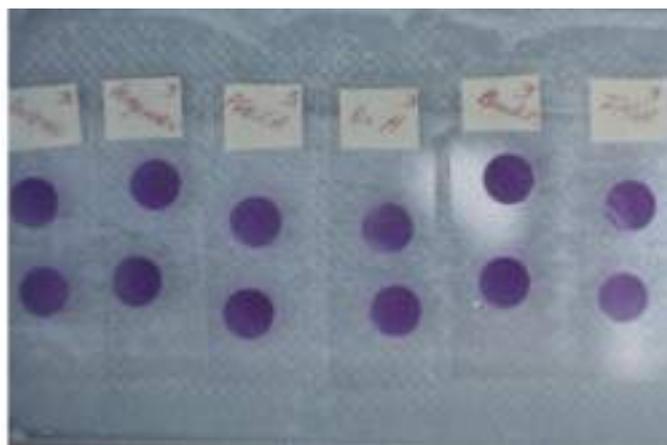
A



B



C



D

Figura 1. Preparación del dispensador y muestreo de conidios en el campo. **A.** Dispensador de discos de agar-cristal violeta, **B.** Toma de impronta, **C.** Corte de discos de agar-cristal violeta una vez afectada la impronta, **D.** Cámara húmeda para conservar los discos de agar-cristal violeta conteniendo los conidios de los hongos analizados.

láminas portaobjetos y el número de hojas analizadas. En este caso una lámina portaobjetos por material evaluado. Las láminas portaobjetos se montan inmediatamente sobre el microscopio compuesto para observar las características morfológicas de los conidios estudiados a través del objetivo 40X.

Resultados y discusión

La ausencia de cristal violeta en el medio dificulta la diferenciación de los conidios de *Pseudocercospora musae* (Figura 2A) y *Paracercospora fijiensis* (Figura 2B). El empleo de cristal violeta al 1% permite diferenciar de inmediato las dos especies. El colorante tiñe los conidios, siendo la coloración más intensa en la cicatriz (hilio) o

punto de inserción de los conidios con el conidióforo, ausente en *P. musae* (Figura 2C) y presente en *P. fijiensis* (Figura 2D).

La adición al medio de estreptomycin y benomyl evita la contaminación por bacterias y la germinación de los conidios, cuyo tubo germinativo podría interferir con las observaciones al microscopio. En estudios sobre monitoreo de resistencia de estos hongos a fungicidas, basta con suprimir el benomyl.

Un método similar al descrito, adicionando o no lactofenol al agar al 1.5%, fue empleado por **Jacome & Schuh** (1993) para monitorear conidios de *M. fijiensis*. Debido a que el lactofenol es incoloro el color de los

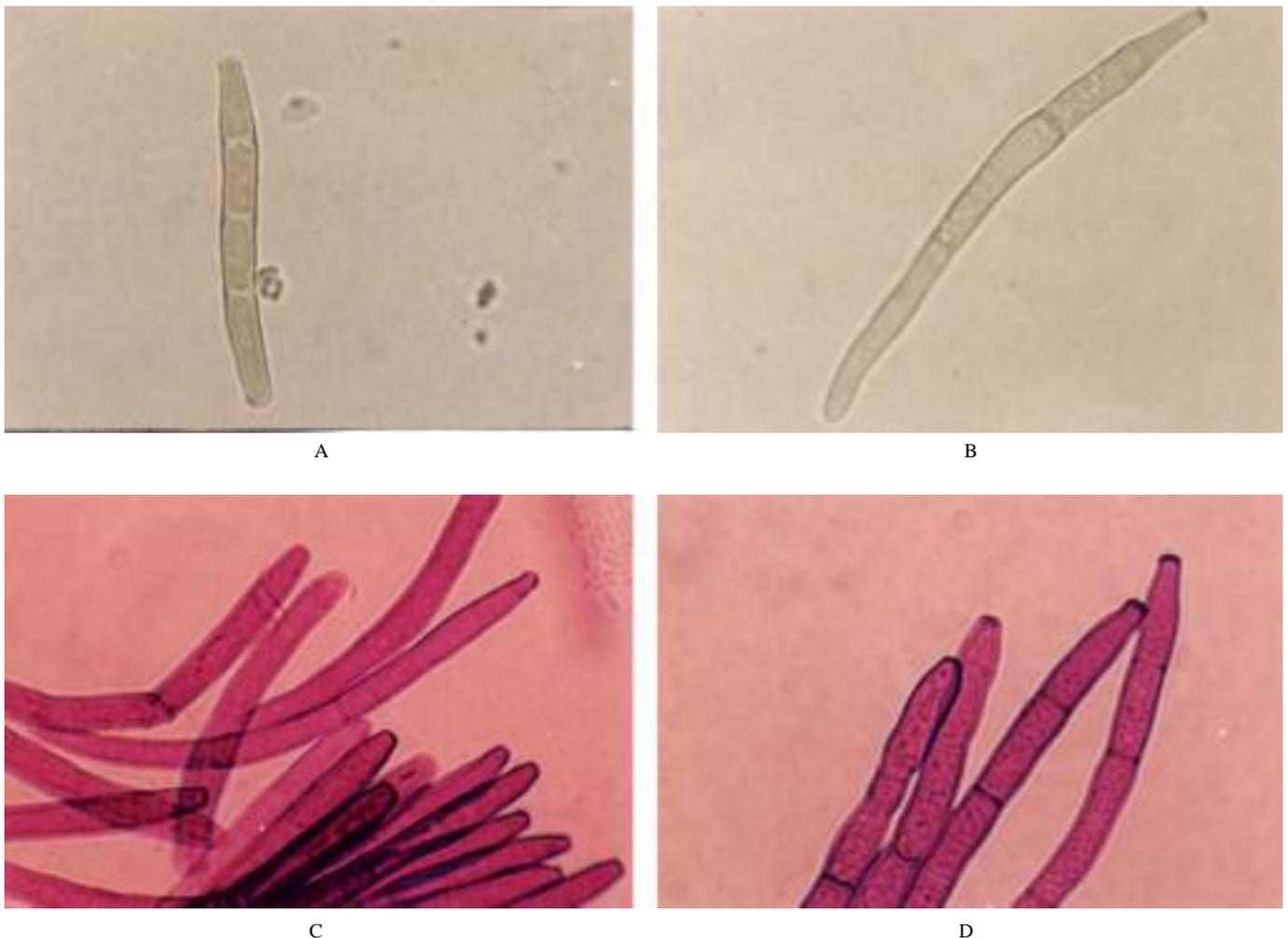


Figura 2. Efectividad de la tinción con cristal violeta de los anamorfos de *M. musicola* y *M. fijiensis*. **A.** Conidio de *Pseudocercospora musae* sin teñir, **B.** Conidio de *Paracercospora fijiensis* sin teñir, **C.** Conidios de *P. musae* teñidos, obsérvese la ausencia del hilio, **D.** Conidios de *P. fijiensis* teñidos, obsérvese la presencia del hilio y la intensidad de color del mismo.

conidios no se altera haciendo difícil la caracterización de la especie. Aunque **Tapia** (1993), ha descrito una metodología para cuantificar y caracterizar las estructuras reproductivas asexuales de *M. musicola* y *M. fijiensis* con base en características de estromas y conidióforos, el método es demasiado tedioso ya que requiere 84 horas para procesar los tejidos obtenidos en el campo y la diferenciación de especies no considera las características descritas de los conidios de ambos hongos. Es de anotar que el tratamiento térmico descrito por **Tapia** (1993) dispersa los conidios del hongo haciéndose aún más difícil su observación. Además, el método no permite establecer una relación precisa en el campo, del número de conidios presentes en los tejidos analizados.

Las dos especies de *Mycosphaerella* también se pueden diferenciar fácilmente a través de las características de las colonias en medio de cultivo, pero como el método descrito previamente, es demasiado demorado, requiriendo unos 10 días (**Du Pont**, 1980). Así mismo, ambas especies se puede diferenciar mediante técnicas moleculares, tales como la de medición de la longitud polimorfa de fragmentos de restricción de ADN (RFLP) (**Carlier et al.**, 1994) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (**Johanson & Jeger**, 1993), pero la utilización de éstas técnicas es muy costosa.

La técnica desarrollada en esta investigación, además de permitir la identificación rápida y segura de los agentes causantes de las sigatokas amarilla y negra, permite obtener una gran cantidad de muestras a un mínimo costo.

Conclusiones

Por primera vez se describe un método preciso para identificar las especies *Mycosphaerella fijiensis* y *M. musicola*, en sus estados anamorfos *Paracercospora fijiensis* y *Pseudocercospora musae*.

El método, además de ser preciso, sencillo y rápido, es altamente económico, ya que permite obtener una gran cantidad de muestras con un mínimo costo, permitiendo además establecer una relación exacta del número de conidios presentes de cada especie de hongo en los materiales analizados.

Esta metodología no solo es útil para identificar correctamente a las especies de hongos causantes de las sigatokas negra y amarilla, sino también, para realizar estudios sobre monitoreo de resistencia de *M. fijiensis* y *M.*

musicola a fungicidas, un problema común en estos patógenos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al convenio ICA-CORPOICA-CIRAD-FLHOR, por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo de investigación.

Referencias bibliográficas

- Carlier, J., Mourichon, X., González-de León, D., Zapater, M.F. & Lebrun, M.H.** 1994. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. *Phytopathology*, **84**(7): 751-755.
- Castañó-Zapata, J. & del Río, L.** 1994. Sigatokas del banano. En: Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. 3ra Edición. Zamorano Academic Press, Honduras. Pp. 217-218.
- Du Pont.** 1980. Black and yellow Sigatokas: Improved identification and management techniques. Du Pont Latin America, Coral Gables, Florida. 17 p.
- Fullerton, R. A.** 1994. Sigatoka leaf diseases. In: Compendium of Tropical Fruit Diseases. Ploetz, R.C. et al. (Editors). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. Pp. 12-14.
- Jacome, L. H. & Schuh, W.** 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. (Trinidad)* **70**(1): 51-59.
- Johanson, A. & Jeger, M.J.** 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycol. Res.* **97**: 670-674.
- Lalancette, N. Jr., Russo, J.M. & Hickey, K.D.** 1984. A simple device for sampling spores to monitor fungicide resistance in the field. *Phytopathology* **74**(12): 1423-1425.
- Leach, R.** 1964. A new form of banana leaf spot in Fiji, Black leaf streak. *World Crops*. Pp. 60-64.
- Mourichon, X. & Fullerton, R. A.** 1990. Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *Mycosphaerella fijiensis* (*Cercospora fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease in bananas and plantains. *Frutis* **45**(3): 213-218.
- Rhodes, A.** 1964. A new disease in Fiji. *Commonwealth Phytopathological New*, Kew, Surrey, England. **10**: 30-41.
- Stover, R.** 1972. Banana, plantain and abaca diseases. Kew, Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute. 316 p.
- Tapia, A.C.** 1993. Distribución altitudinal de la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*) y la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en Costa Rica. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica. 77p.

