

Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos

Jean Carlier, Dirk De Waele y Jean-Vincent Escalant



La misión de la **Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano** (INIBAP) es aumentar de manera sostenible la productividad del banano y el plátano cultivados por pequeños productores para el consumo doméstico y mercados locales y de exportación.

El programa tiene cuatro objetivos principales:

Organizar y coordinar un esfuerzo global de investigación sobre banano y plátano para el desarrollo, la evaluación y la diseminación de cultivares mejorados y para la conservación y utilización de la diversidad de las Musáceas;

Promover y fortalecer colaboraciones en la investigación relacionada con banano y plátano a los niveles nacional, regional e internacional;

Fortalecer la capacidad de los SNIA para conducir actividades de investigación y desarrollo sobre banano y plátano;

Coordinar, facilitar y apoyar la producción, recopilación y el intercambio de información y de documentación sobre banano y plátano.

INIBAP es un programa del Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), un centro *Future Harvest*.

El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) es una organización científica internacional independiente que busca el avance en la conservación y uso de la diversidad fitogenética para el bienestar de las generaciones presentes y futuras. Es uno de los 16 Centros de Futura Cosecha apoyados por el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCIAI), una asociación cuyos miembros provienen de los sectores privado y público los cuales apoyan los esfuerzos para promover los avances de la ciencia con el fin de reducir el hambre y la pobreza, mejorar la nutrición y la salud de las personas y proteger el ambiente. El IPGRI tiene su sede en Maccaresse, cerca de Roma, Italia, con oficinas en más de 20 otros países alrededor del mundo. El Instituto opera a través de tres programas: (1) el Programa de Recursos Fitogenéticos, (2) el Programa de Apoyo a los Recursos Genéticos del GCIAI y (3) la Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano (INIBAP).

El estatus internacional del IPGRI es otorgado bajo un Acuerdo de Establecimiento el cual, para el mes de enero de 2003, fue firmado por los Gobiernos de Argelia, Australia, Bélgica, Benin, Bolivia, Brasil, Burkina Faso, Camerún, Chile, China, Chipre, Congo, Costa Rica, Côte d'Ivoire, Dinamarca, Ecuador, Egipto, Eslovaquia, Grecia, Guinea, Hungría, India, Indonesia, Irán, Israel, Italia, Jordania, Kenia, Malasia, Mauritania, Maruecos, Noruega, Pakistán, Panamá, Perú, Polonia, Portugal, República Checa, Rumania, Rusia, Senegal, Sudan, Suiza, Siria, Túnez, Turquía, Uganda y Ucrania.

El apoyo financiero para la investigación de IPGRI lo brindan más de 150 donantes, incluyendo a los gobiernos, fundaciones privadas y organizaciones internacionales. Para obtener más detalles sobre los donantes y actividades de investigación, por favor diríjase a los Informes Anuales de IPGRI, que están disponibles en forma impresa según solicitud a ipgri-publications@cgiar.org o en el sitio de Internet de IPGRI (www.ipgri.cgiar.org).

Las designaciones geográficas empleadas y el material presentado en esta publicación no implican que sea la expresión de opiniones por parte de IPGRI o de GCIAI concernientes al estado legal de cualquier país, territorio, país o área o sus autoridades, o concernientes a la delimitación de sus fronteras o límites. De manera similar, los puntos de vista expresados son los de los autores y no necesariamente reflejan los puntos de vista de estas organizaciones.

La mención de un nombre de propietario no constituye la aprobación del producto y se presenta solo para la información.

Citación:

Carlier J., D. De Waele y J.V. Escalant. 2003 Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por Fusarium, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos. Evaluación de comportamiento (A. Vézina y C. Picq, eds). Guías técnicas INIBAP 7. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.

INIBAP ISBN: 2-910810-59-3

© International Plant Genetic Resources Institute, 2003



Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos

Evaluación de comportamiento

Jean Carlier¹, Dirk de Waele² y Jean-Vincent Escalant³ en colaboración con los grupos de trabajo sobre *Fusarium*, Sigatoka y nematodos de PROMUSA.

Anne Vézina³ y Claudine Picq³, editores

1 Cirad-amis, Avenue Agropolis – TA 40/02, 34398 Montpellier Cedex 5, Francia

2 KULeuven, Laboratory of Tropical Crop Improvement, Kasteelpark Arenberg 13, B-3001 Leuven, Bélgica

3 Inibap, Parc Scientifique Agropolis 2, 34397 Montpellier Cedex 5, Francia

Prefacio

Estas Guías Técnicas reemplazan las Guías Técnicas 1 (*Cribado de germoplasma de Musa para la resistencia y tolerancia a nematodos*) y 3 (*Evaluación de germoplasma de Musa para la resistencia a las enfermedades de la Sigatoka y marchitamiento por Fusarium*) en lo que a la evaluación de comportamiento se refiere. Las Guías Técnicas para las evaluaciones extensivas, que también formaban parte de las Guías Técnicas 3, se publican separadamente.

Las secciones sobre el marchitamiento por *Fusarium* y las enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* fueron actualizadas de acuerdo a las recomendaciones y comentarios realizados después de analizar los resultados del IMTP II.

INIBAP y los autores desean agradecer a todos los científicos quienes contribuyeron con estas guías.

Contenido

1. Introducción	5
Nociones de resistencia y tolerancia	5
2. Evaluación de la resistencia al marchitamiento por <i>Fusarium</i>	6
Introducción	6
Cultivares de referencia	6
Establecimiento de las parcelas	6
Identificación del patógeno	7
Diseño experimental	7
Prácticas agronómicas	8
Información a recolectar	9
3. Evaluación de la resistencia a las enfermedades de las manchas foliares causadas por <i>Mycosphaerella</i> spp.	15
Introducción	15
Cultivares de referencia	15
Establecimiento de las parcelas	15
Identificación del patógeno	16
Diseño experimental	16
Prácticas agronómicas	17
Información a recolectar	19
4. Evaluación de la resistencia a los nematodos	21
Introducción	21
Cultivares de referencia	22
Genotipos a evaluar	22
Establecimiento de las parcelas	23
Identificación de los nematodos	23
Diseño experimental	24
Prácticas agronómicas	24
Información a recolectar	24

Apéndices	27
Apéndice I. Manipulación del material vegetal	29
Apéndice II. Cómo aislar muestras de <i>Fusarium</i> para analizar el grupo de compatibilidad vegetativo	33
Apéndice III. Formularios de campo para anotar la información sobre los experimentos resistencia al marchitamiento por <i>Fusarium</i>	34
Apéndice IV. Identificación de los patógenos <i>Mycosphaerella</i>	37
Apéndice V. Hoja más joven manchada	42
Apéndice VI. Formularios de campo para anotar la información sobre los experimentos de resistencia a las enfermedades causadas por <i>Mycosphaerella</i>	43
Apéndice VII. Identificación y preparación de los nematodos endoparásitos	44
Apéndice VIII. Protocolos para la evaluación de la reproducción de nematodos	48
Apéndice IX. Protocolo para la evaluación de los daños ocasionados por los nematodos	51
Apéndice X. Daños ocasionados por los nematodos	53
Apéndice XI. Formularios de campo para anotar la información agronómica y ambiental	54
Bibliografía	56

1. Introducción

El marchitamiento por *Fusarium*, las enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* spp. y los nematodos se reconocen como las plagas y enfermedades más importantes de los bananos¹. Este documento proporciona información sobre los protocolos para la evaluación de comportamiento de la resistencia a estos patógenos y parásitos. Contrario a las evaluaciones extensivas, que son evaluaciones de la resistencia a las enfermedades más completas realizadas en pocos sitios (Guías Técnicas 6 de INIBAP), las evaluaciones de comportamiento utilizan un protocolo simplificado para obtener la información sobre el comportamiento de los cultivares e híbridos bajo condiciones locales, así como la información básica sobre la resistencia y tolerancia a las enfermedades.

Estas guías fueron elaboradas en colaboración con los grupos de trabajo sobre *Fusarium*, Sigatoka y nematodos del programa PROMUSA y con aportes del personal de INIBAP, y su objetivo es ayudar a los investigadores a:

- diseñar su ensayo,
- escoger el lugar apropiado para el ensayo,
- infestar artificialmente el sitio, en caso de que no esté suficientemente infestado con el patógeno (sólo para los sitios con marchitamiento por *Fusarium* y nematodos),
- evaluar la resistencia/tolerancia de los genotipos a las enfermedades y características agronómicas.

Nociones de resistencia y tolerancia

La resistencia/susceptibilidad y la tolerancia/sensibilidad se definen como cualidades independientes y relativas de una planta hospedante basándose en las comparaciones entre los genotipos. La resistencia/susceptibilidad se refiere a la habilidad de la planta de prevenir o limitar el desarrollo de la plaga, mientras que la tolerancia/sensibilidad es la habilidad de la planta de sobrevivir a la presencia de una plaga. Una planta hospedante puede contener (resistencia) o permitir (susceptibilidad) el desarrollo y reproducción del patógeno; puede sufrir pocos daños (tolerancia), aún cuando está fuertemente infectada, o muchos daños (sensibilidad), aún cuando está ligeramente infectada.

¹ A través de todo el texto la palabra bananos se utiliza tanto para los bananos como para los plátanos.

2. Evaluación de la resistencia al marchitamiento por *Fusarium*

Introducción

El patógeno responsable por el marchitamiento por *Fusarium* (también conocido como mal de Panamá), es un hongo del suelo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* – *Foc*, que por primera vez fue reconocido en 1874 en Australia. Para la década de los años 50, la enfermedad había alcanzado tales proporciones epidémicas, que fue considerada como una de las enfermedades de las plantas más destructivas en la historia. La infección ocurre cuando el patógeno penetra en las raíces de la planta de banano. Luego el hongo invade los vasos del xilema y, si no es bloqueado por las respuestas de oclusión vascular del hospedante, avanza en el cormo.

Cultivares de referencia

Los clones, contra los cuales deben ser evaluados los nuevos híbridos mejorados con respecto a su reacción al marchitamiento por *Fusarium*, son los siguientes:

Gros Michel (AAA)	Suceptible a Raza 1	ITC1122
Bluggoe (ABB) – Cachaco	Suceptible a Raza 2	ITC0643
Cavendish (AAA) cv. Williams	Suceptible a Raza 4	ITC0570
cv. Rose	Resistente	ITC0712
Cultivar local (si no es Cavendish)	Será seleccionado por el colaborador en cada sitio de evaluación como un material estándar apropiado.	

INIBAP mantiene un listado de material disponible indizado contra virus, para seleccionar los genotipos de referencia. Por favor comuníquese con el coordinador del IMTP en INIBAP. Para la información sobre el manejo del material vegetal, refiérase al Apéndice I.

Establecimiento de las parcelas

Con el propósito de efectuar una evaluación apropiada de la resistencia del germoplasma al marchitamiento por *Fusarium*, es importante que el sitio de evaluación esté una área de incidencia conocida. De ser posible que se establezca dentro de la propiedad de un agricultor, y además que se maneje siguiendo las prácticas locales aplicadas al banano.

El sitio se deberá infestar uniformemente con una sola raza de *Foc*. Si es posible, se debe sembrar un clon altamente susceptible (p.e. Gros Michel, Silk o la variedad local susceptible) un ciclo antes del establecimiento del experimento. Al momento de la cosecha, éstas plantas se deberán cortar y arar incorporándolas al suelo. Antes de sembrar el experimento, el sitio deberá ser arado profundamente para distribuir uniformemente el inóculo en todo el lugar. Se debe tener cuidado de no infestar el sitio con más de una raza de *Foc*. Para evitar la contaminación con otras razas, se recomienda no introducir en el sitio de evaluación plantas infectadas ni suelo de otros sitios.

Identificación del patógeno

Antes del establecimiento del experimento, se debe determinar la identidad de la raza de *Foc* presente en el sitio. Si esta información no está disponible, se deberán recolectar muestras de plantas de banano del lugar y enviarlas a un laboratorio reconocido para su análisis. Los detalles sobre cómo enviar las muestras se encuentran en el Apéndice II.

Diseño experimental

Una vez que las plantas alcancen de 0.3-0.5 m de altura se puede llevarlas al campo experimental. El diseño experimental dependerá de las características particulares del sitio. Se describe alternativas más adelante. Se recomienda utilizar un diseño de bloques completamente al azar en los lugares donde sea práctico y factible. Sin embargo, cualquiera que sea el diseño, la densidad de siembra no deberá exceder las 2000 plantas por hectárea.

Diseño completamente al azar (DCA)

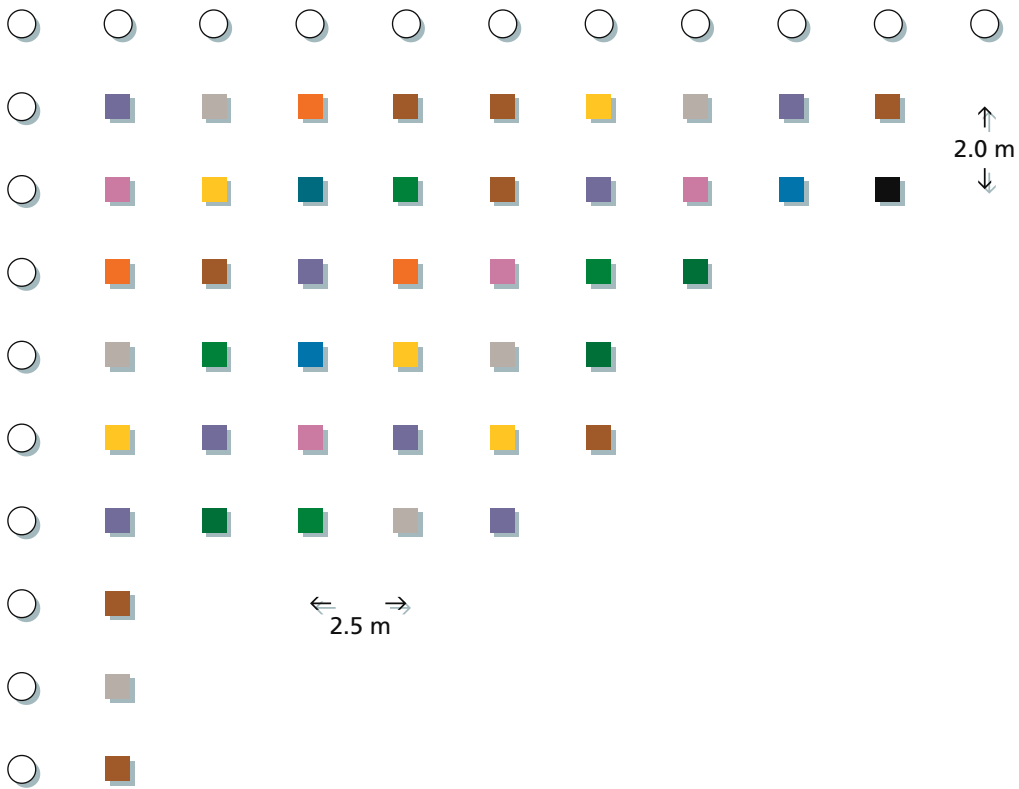
Este diseño se utilizará cuando no exista una fuente identificable de variación en el sitio de evaluación, por ejemplo cuando las condiciones de suelo, gradiente, fecha de siembra, etc. son uniformes. Este es un diseño muy potente, que permite efectuar análisis estadísticos aún cuando existan números diferentes de unidades experimentales por tratamiento.

Se recomienda un espaciamiento entre plantas de 2m x 2.5m, no obstante, este puede variar de acuerdo con las prácticas de manejo normales del instituto o del agricultor.

Veinte repeticiones por tratamiento. El sitio experimental deberá estar rodeado por una hilera de plantas de borde. En la Figura 1 se presenta un ejemplo de este tipo de distribución.

Diseño de bloques completamente al azar (DBCA)

Se puede utilizar este diseño cuando exista una fuente identificable de variación y las unidades experimentales pueden ser agrupadas apropiadamente. El objetivo de agrupar es el de mantener las unidades en un bloque lo más uniforme posible, de manera que las diferencias que se observen se deban en gran parte a los tratamientos (en este caso a los genotipos). Las fuentes de variación, tales como pendiente, gradiente de pH, fecha de siembra, etc. se deberán identificar y distribuir los bloques para justificar esta variación. Los bloques, también llamados repeticiones, deberán consistir de un grupo de parcelas casi cuadrado. Las parcelas entre bloques se deberán colocar en hileras escalonadas dobles, como se muestra en la Figura 2, para disminuir los efectos de competencia entre las plantas. Deberá haber al menos seis plantas por parcela, sin embargo la información se tomará solo de las plantas centrales; las dos plantas que se encuentran en la parte de afuera se consideran plantas de borde.



Planta de borde

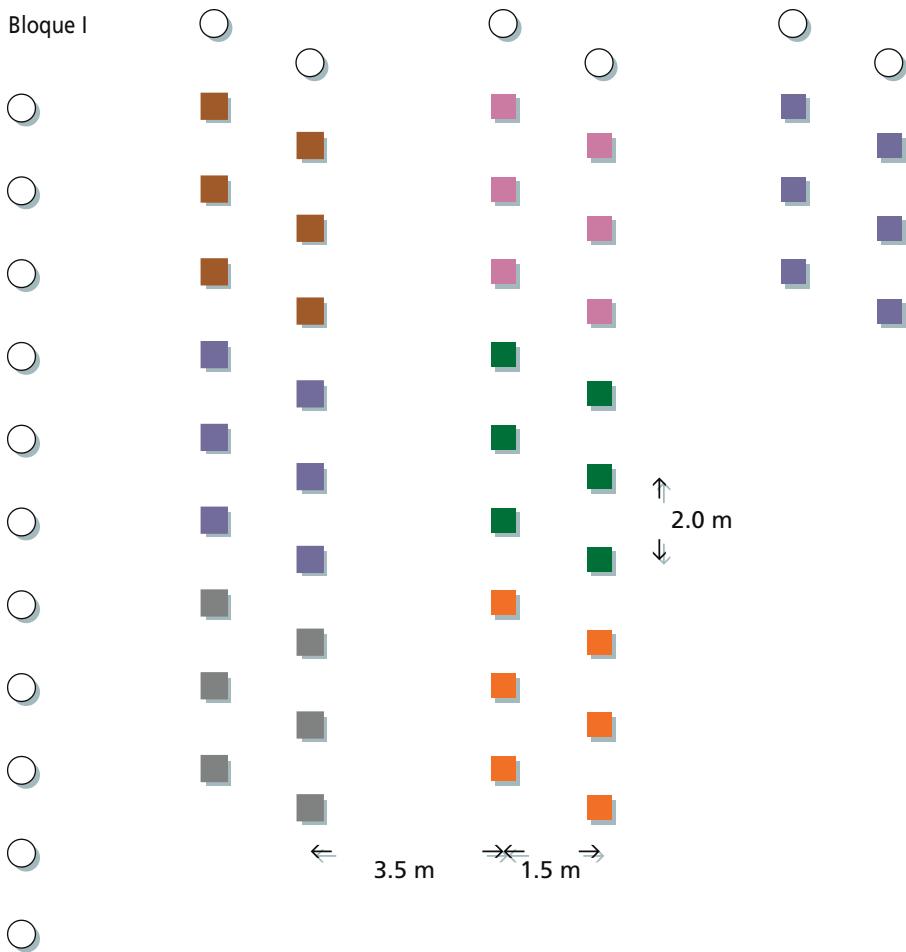
Genotipos diferentes

Se debe sembrar cinco bloques o repeticiones. Todos los genotipos se asignarán en forma aleatoria a las parcelas dentro de los bloques. Esta distribución se puede observar en la Figura 2.

Si requiere mayor información o recomendaciones sobre el diseño experimental, por favor comuníquese con Natalie Moore (correo electrónico: MooreN@prose.qld.gov.au).

Prácticas agronómicas

La aplicación de fertilizantes y la irrigación se deberá efectuar de acuerdo con las prácticas locales. No se deberá aplicar fungicidas. En los lugares donde es una práctica común, las matas se deberán deshijar cada tres meses empleando los métodos locales, para dejar un solo vástago. De igual manera, la práctica de deshojar se realizará sólo si esto constituye una práctica rutinaria en el sitio de evaluación. Los experimentos deberán conducirse para el primer y segundo ciclos de cultivo de la planta.



○ Planta de borde ■ ■ ■ ■ ■ Genotipos diferentes

Los bloques deben ser lo mas cuadrados posible para minimizar la variación.

Figura 2. Diseño de bloques completamente al azar para evaluar el marchitamiento por Fusarium.

Información a recolectar

Evolución de la enfermedad

Tres meses después de la siembra, las plantas se revisarán mensualmente para observar el desarrollo de los síntomas. Las plantas que sin lugar a duda estén afectadas por el marchitamiento por Fusarium se anotarán como enfermas en el formulario de campo 1, Apéndice III y se marcarán para futuras referencias. De ahí en adelante, estas plantas se observarán únicamente cuando mueran o produzcan frutos. Los campos se deberán inspeccionar con mayor frecuencia (semanalmente) cuando se acerque la época de floración para determinar con

exactitud ésta fecha. Si las plantas van a morir antes de dar frutos, se deberán examinar internamente para verificar la presencia de la enfermedad. Si éstas finalmente dan fruto, las estimaciones internas de severidad de la enfermedad se tomarán al tiempo de la cosecha.

Síntomas internos

Para el primer ciclo de cultivo, sólo se deben anotar los síntomas internos del pseudotallo. Al momento de la cosecha, corte la planta en la base del pseudotallo. Para determinar la extensión de la decoloración vascular en el pseudotallo, haga cortes transversales desde la base del pseudotallo hacia arriba para examinar los tejidos internos que aparezcan después de cada corte. Observe el punto en el cual la decoloración ya no es visible y anote la distancia que exista entre ese punto y la base del pseudotallo. Utilice el formulario de campo 1 en el Apéndice III para anotar los síntomas externos e internos y el formulario de campo 2 para sintetizar los datos.

Para la segunda cosecha (hijo siguiente), se deberán evaluar los síntomas dentro del pseudotallo y si es posible dentro del cormo. Saque el cormo completo del suelo, corte las raíces y quite el exceso de tierra. Utilice una "guillotina" (Figura 3) u otro instrumento apropiado, para cortar secciones transversales del cormo hasta obtener cinco partes de igual grosor por cormo. Se debe examinar la parte superior de cada sección y anotar la extensión de la decoloración vascular utilizando para esto una escala de 1 a 6 (láminas de 1 a 6 p. 12). Se debe calcular y anotar una calificación promedio para las cinco secciones. Para la segunda cosecha (hijo siguiente), se deberán evaluar los síntomas dentro del pseudotallo y si es posible dentro del cormo.

Utilice el formulario de campo 3 en el Apéndice III si decide anotar los datos del cormo.

Nota: El material del cormo y del pseudotallo no se debe remover del sitio de cosecha ni antes ni después de la evaluación.

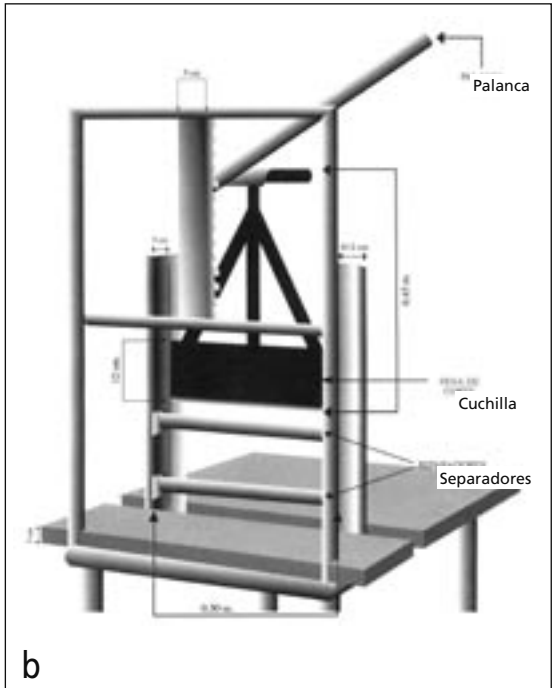
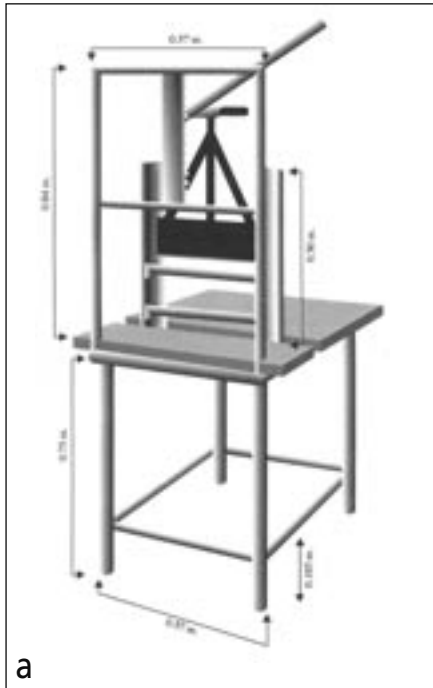


Figura 3. Guillotina para cortar cormos de banano.

3a. Vista global de la guillotina.

3b. Detalles y medidas de la guillotina.

3c. Superficie para cortar que muestra la hoja de corte y las muescas que sostienen las reglas espaciadores empleadas para definir el ancho de la tajada.

3d. Vista detallada de la palanca y de la rejilla.

3e. La guillotina en acción.

(Fotografías y diseño, cortesía del Dr. Mauricio Rivera, FHIA)





1. Cormo completamente limpio, sin decoloración vascular.



2. Puntos aislados de decoloración en el tejido vascular.



3. Decoloración de hasta 1/3 del tejido vascular.



4. Decoloración de entre 1/3 y 2/3 del tejido vascular.



5. Decoloración mayor a los 2/3 del tejido vascular.



6. Decoloración total del tejido vascular.

Láminas 1-6. Escala de evaluación de los síntomas internos ocasionados por el marchitamiento por *Fusarium* (Fotografías cortesía del Dr Zilton Cordeiro, EMBRAPA-CNPMPF).

Información agronómica

La información que aparece a continuación deberá anotarse. La tabla 1 indica cuando los datos deben ser recopilados. Utilice los formularios de campo 6 en el Apéndice XI para registrar los datos.

Encargado

Fecha de siembra

Tiempo de la siembra a la floración (*días*)

Para calcularlo en días utilice las fechas de siembra y emergencia total del racimo.

Altura del pseudotallo al momento de la parición (emergencia del racimo) (*cm*)

Corresponde a la distancia en cm desde la base del pseudotallo hasta el punto de emergencia del racimo.

Altura del hijo (hijo siguiente) al momento de la parición (*cm*)

Corresponde a la distancia en cm desde el suelo hasta la última axila de la hoja. Todos los demás hijos con excepción del hijo seleccionado se eliminarán conforme aparezcan.

Número de hojas funcionales

Las hojas funcionales son las que presentan actividad fotosintética. Una hoja es funcional cuando presenta más del 50% de área verde.

Ciclo de cultivo (*días*)

Para calcularlo en días, considere las fechas desde la siembra hasta la cosecha.

Circunferencia del pseudotallo al momento de la cosecha (*cm*)

Se mide a 1m de la base del pseudotallo.

Peso del racimo (*kg*)

Corte el pedúnculo del racimo encima de la primera mano y al nivel de la última cicatriz de bráctea e inmediatamente debajo de la última mano.

Número de manos en el racimo a la cosecha

Corte las manos de cada racimo después de pesarlo y anote el número de manos.

Número de frutos a la cosecha

Peso del fruto (*g*)

Promedio: Dividir el peso colectivo de las manos (cortadas del pedúnculo) por el número de frutos.

Información ambiental

También es necesario monitorear las condiciones climáticas. Se debe obtener lecturas semanales en una estación meteorológica situada lo más cerca posible al sitio experimental. El formulario de campo 7 para recolectar esta información se encuentra en el Apéndice XI.

Tabla 1. Programa para el registro de la evolución de la enfermedad y de los datos agronómicos.

Tipo de datos	Fase de crecimiento (3 meses después de la siembra)	Parición	Cosecha
Datos de evolución de la enfermedad			
Síntomas externos	Mensualmente	Mensualmente	
Síntomas internos			X
Información agronómica			
Tiempo de la siembra a la parición		X	
Altura del pseudotallo		X	
Altura del hijo		X	
Número de hojas funcionales		a la floración	X
Ciclo de cultivo			X
Circunferencia del pseudotallo			X
Peso del racimo			X
Número de manos en el racimo			X
Número de frutos			X
Peso promedio de los frutos			X

Prácticas de manejo

Se deberán anotar los datos sobre aplicaciones de fertilizantes, medidas de control de nemátodos/picudos y manejo de la irrigación/drenaje.

3. Evaluación de la resistencia a las enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* spp.

Introducción

Las enfermedades de las manchas foliares de los bananos incluyen tres hongos ascomicetos patogénicos relacionados: *Mycosphaerella fijiensis*, que causa la raya negra de la hoja (también conocida como Sigatoka negra), *M. musicola*, responsable por la enfermedad de Sigatoka (también conocida como Sigatoka amarilla) y *M. eumusae*, descubierta recientemente que representa el agente causal de la enfermedad de la mancha foliar eumusae (conocida anteriormente como la enfermedad de la mancha foliar Septoria). La raya negra de la hoja y la enfermedad de Sigatoka pueden causar una defoliación extensa, pero *M. fijiensis* se caracteriza por su poder patógeno más fuerte en un rango más amplio de hospedantes, lo que la hace la enfermedad foliar de los bananos más destructora. En general, los hongos son diseminados localmente mediante ascósporas y conidios. Se cree que la dispersión de las enfermedades a grandes distancias se realiza por la transferencia de germoplasma (retoños infectados, hojas enfermas) y por ascósporas mediante el viento.

Cultivares de referencia

Los clones, contra los cuales deben ser evaluados los nuevos híbridos mejorados con respecto a su reacción las enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* son los siguientes:

Yangambi km 5	Altamente resistente	ITC1123
Calcutta 4	Altamente resistente	ITC0249
Pisang lilin	Parcialmente resistente (alto)	ITC1400
Pisang Ceylan	Parcialmente resistente	ITC1441
Pisang Berlin	Susceptible	ITC0611
Grande naine	Susceptible	ITC1256
Cultivar local	Seleccionado por el colaborador en cada sitio como el estándar local apropiado para comparar las reacciones	

INIBAP mantiene un listado de material disponible indizado contra virus, para seleccionar los genotipos de referencia. Por favor comuníquese con el coordinador del IMTP en INIBAP. Para la información sobre el manejo del material vegetal, refiérase al Apéndice I.

Establecimiento de las parcelas

Las parcelas deben establecerse en sitios con suficiente presencia del patógeno. El sitio de evaluación deberá establecerse en los terrenos de un agricultor y manejarse de acuerdo con las prácticas locales empleadas para el banano. Aún más, el diseño de campo deberá incluir parcelas de clones susceptibles interca-

ladas con las que están bajo evaluación. Se pueden emplear los clones locales susceptibles.

Con frecuencia es difícil diferenciar en el campo los síntomas de las diferentes enfermedades foliares causadas por *Mycosphaerella*. Cuando es posible, es preferible seleccionar sitios donde solo una enfermedad está presente. Si se mezclan los patógenos, es más difícil comparar los resultados obtenidos en ese sitio con los de otros sitios de evaluación.

Identificación del patógeno

Las enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* registradas en *Musa* con mayor frecuencia son *M. fijiensis* y *M. musicola*. *M. eumusae* fue registrada solo recientemente. Este patógeno fue descubierto en el sur y sudeste de Asia (Carlier *et al.* 2000, Crous y Mourichon 2002). En 2001, se han detectado las tres especies en un área muy pequeña cerca de Kuala Lumpur, Malasia (J. Carlier comunicación personal).

Antes de evaluar los nuevos híbridos o clones seleccionados, es muy importante conocer exactamente cual de las especies de *Mycosphaerella* está presente en el sitio y, si es posible, en el país. El muestreo e identificación del patógeno se describen en el Apéndice IV.

Diseño experimental

Una vez que las plantas alcancen una altura de 0.3-0.5 m, se pueden llevar al campo experimental. El diseño experimental dependerá de las características particulares del lugar. En esta misma sección se presentan varias alternativas. En aquellos lugares en donde sea práctico y factible, se debe utilizar un diseño de bloques completamente al azar. Sin embargo, cualquiera que sea el diseño, la densidad de siembra no deberá exceder las 2000 plantas por hectárea.

Diseño completamente al azar (DCA)

Se deberá utilizar un diseño completamente al azar cuando no existe una fuente de variación identificable en el sitio de evaluación; por ejemplo, el sitio es uniforme en cuanto a tipo de suelo, pendiente, fecha de siembra, etc. Este es un diseño muy poderoso el cual permite efectuar análisis estadísticos aún cuando existan diferentes números de unidades experimentales por tratamiento.

Se recomienda un espaciamiento entre plantas de 2m x 2.5m, sin embargo, se puede utilizar un espaciamiento diferente si éste es más apropiado a las prácticas de manejo del instituto/agricultores.

Ocho a diez repeticiones por tratamiento. El sitio experimental estará rodeado por una hilera de plantas y su distribución en tresbolillo (intercalado con plantas susceptibles) como se muestra en la Figura 4.

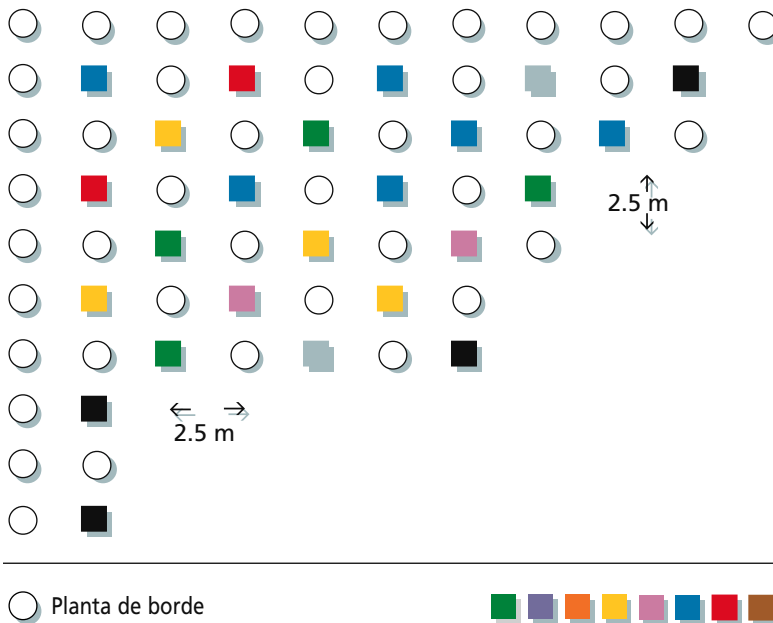


Figure 4. Diseño completamente al azar en tresbolillo para evaluar las enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* spp.

Diseño de bloque completamente al azar (DBCA)

Este tipo de diseño se puede utilizar cuando existe una fuente identificable de variación y las unidades experimentales se pueden agrupar de acuerdo a esta fuente. El objetivo de agrupar es el de mantener las unidades en un bloque lo más uniforme posible, de manera que las diferencias que surjan se deban en gran parte a los tratamientos (en este caso a los genotipos). Las fuentes de variación, tales como pendiente, gradiente de pH, fecha de siembra, etc. se deberán identificar y distribuir los bloques de acuerdo a esta variación. Los bloques, también llamados repeticiones, deberán consistir de un grupo de parcelas casi cuadrado.

Se deben sembrar de tres a cuatro bloques o repeticiones. Todos los genotipos serán asignados al azar a las parcelas dentro de los bloques. Cada parcela contará con tres a seis plantas. El número de bloques y plantas por parcela dependerá del terreno y de los recursos humanos disponibles. La distribución se muestra en la Figura 5.

Si requiere mayor información o recomendaciones sobre el diseño experimental, por favor comuníquese con Jean-Vincent Escalant (correo electrónico: j.escalant@cgiar.org).

Prácticas agronómicas

Tanto la fertilización como la irrigación se deberán optimizar. No aplique ningún tipo de fungicidas. En aquellos lugares donde se practica en forma

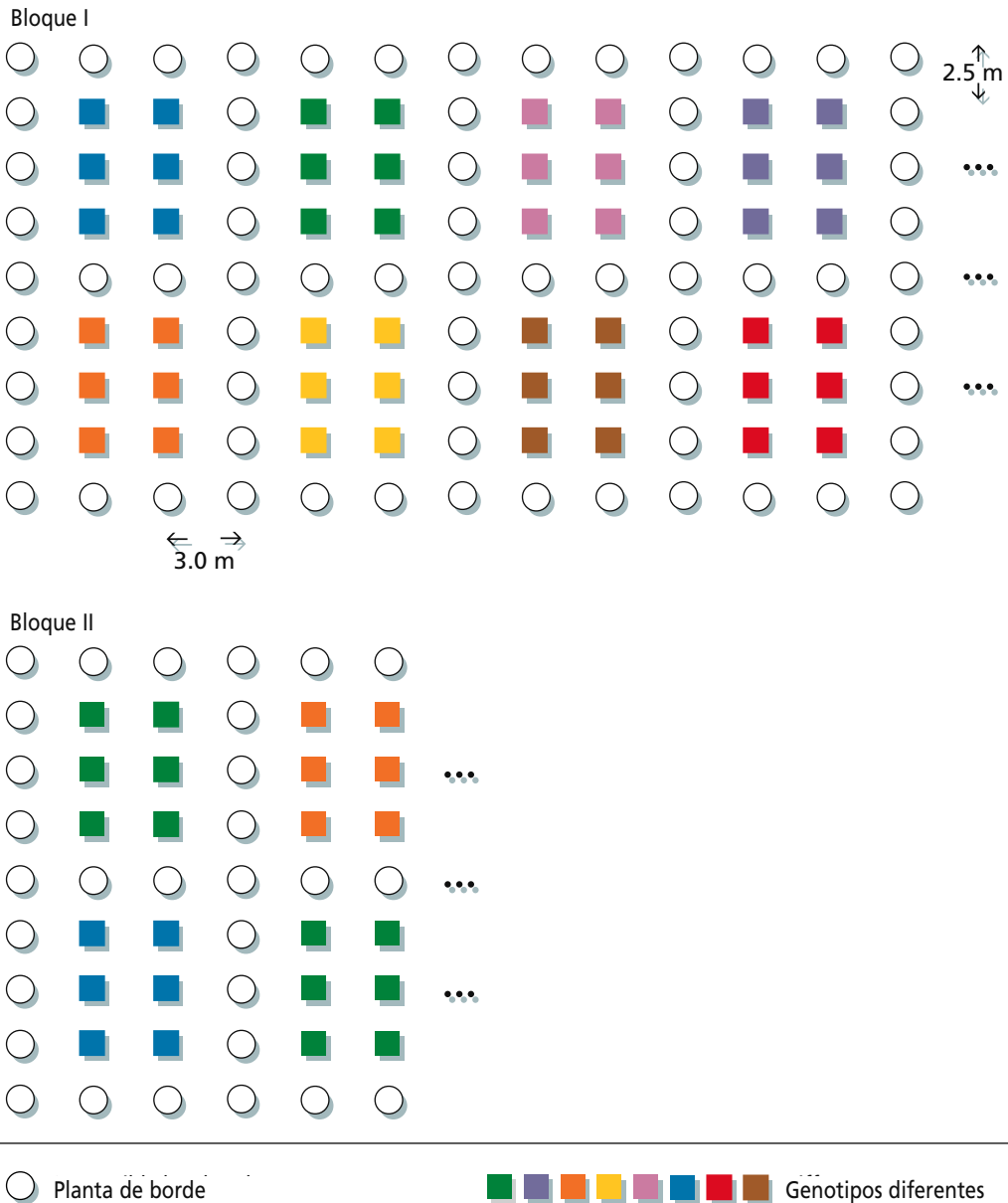


Figura 5. Diseño de bloques completamente al azar para evaluar las enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* spp.

rutinaria, las matas deberán deshijarse cada tres meses utilizando los métodos locales y se deberá dejar únicamente un vástago. Los experimentos deberán conducirse durante el primer y segundo ciclo de producción.

Información a recolectar

Evolución de la enfermedad

Solo se anotarán dos variables: La hoja más joven manchada al momento de la floración (Vakili 1968) y el número de hojas erectas al momento de la floración y cosecha.

Hoja más joven manchada (HMJM)

Esta corresponde a la primera hoja totalmente abierta que presenta 10 ó más lesiones discretas necrosadas y maduras o un área grande necrosada con 10 centros secos de color claro, contando las hojas de arriba hacia abajo (ver Apéndice V).

Número de hojas erectas (NHE):

Es el número de hojas, contando desde la hoja más joven (p.e. la más alta y sin abrir) hacia abajo. No cuente aquellas hojas que tengan el peciolo doblado hacia atrás, las demás hojas deberán anotarse sin importar su color o el de su peciolo.

Estas dos variables deberán registrarse para cada planta. A cada planta en el experimento se le asignará una identificación única, la cual facilitará su posterior identificación y seguimiento. Esta identificación podría ser un número entero entre 1 y el número total de plantas en el experimento, asignado en forma correlativa. El formulario de campo número 4 en el Apéndice VI, ofrece un modelo para las anotaciones. Por favor anote también el número de bloque o repetición. Este sistema permite analizar la información con submuestreo, lo cual es mas preciso.

Las dos variables anotadas permitirán calcular el índice de hojas no manchadas (IHNM). Este índice es la proporción de hojas en pie sin los síntomas típicos de la última etapa de la Sigatoka negra; o sea, una mancha negra con el centro necrosado (Ortiz *et al.* 1997). Este índice suministra una estimación del área de la hoja disponible para fotosíntesis antes del llenado de los frutos y es una medida de la resistencia de *Musa* a la Sigatoka. Además de lo anterior, corrige la diferencia en el número de hojas producidas por diferentes tipos de bananos y plátanos.

Se calcula utilizando la ecuación siguiente:

$$IHNM = \frac{100 * (HMJM) - 1}{NHE}$$

Características agronómicas

Por favor refiérase a la página 13 donde se encuentra una lista completa de variables a evaluar. La tabla 2 indica cuando los datos deben ser recopilados. Utilice el formulario de campo 6 en el Apéndice XI para registrar los datos.

Tabla 2. Programa para el registro de la evolución de la enfermedad y de los datos agronómicos.

Tipo de datos	Fase de crecimiento (3 meses después de la siembra)	Floración	Fase de la floración a la cosecha	Cosecha
Datos de evolución de la enfermedad				
Hoja más joven manchada	X	X	X	
Número de hojas erectas		X		
Información agronómica				
Tiempo de la siembra a la parición		X		
Altura del pseudotallo		X		
Altura del hijo sucesor		X		
Número de hojas funcionales	X	X		X
Ciclo de cultivo				X
Circunferencia del pseudotallo				X
Peso del racimo				X
Número de manos en el racimo				X
Número de frutos				X
Peso del fruto				X

Información ambiental

Esta información se deberá coleccionar en la estación meteorológica más cercana al experimento. En los experimentos que se encuentren en terrenos de institutos colaboradores, esto no será difícil pues muchos de ellos tienen sus propios registros ambientales.

Las fluctuaciones de temperatura y humedad se deben monitorear diariamente. Las lecturas deberán realizarse lo más temprano posible cada mañana y siempre a la misma hora. La precipitación podría calcularse semanalmente si no se pueden realizar lecturas diarias. Registrar los datos desde la fecha de plantación hasta la fecha de la cosecha. Se debe analizar el suelo del sitio de evaluación. Cuando es posible, se debe proveer un mapa de las tendencias climáticas a largo plazo, éste podría suministrar mayor información sobre las fluctuaciones anuales en cuanto a temperatura y precipitación.

En el formulario de campo 7, Apéndice XI, se presenta un formato para anotar la información ambiental.

Prácticas de manejo

Es necesario incluir información sobre la aplicación de fertilizantes, medidas de control de nematodos/picudos y prácticas de irrigación/drenajes.

4. Evaluación de la resistencia a los nematodos

Introducción

En muchas regiones productoras de banano, las pérdidas en los cultivos causadas por los nematodos son muy altas, con un promedio anual de pérdidas de rendimiento de alrededor de 20% a nivel mundial (Sasser y Frackman 1987). Debido a que los nematodos de los bananos atacan los tejidos de las raíces y del cormo, el crecimiento de la planta y su rendimiento son afectados por la reducción de las funciones mecánicas (anclaje) y fisiológicas (absorción y transporte de agua y nutrientes) del sistema radical.

Para controlar a los nematodos se puede utilizar la rotación de cultivos y nematocidas (Gowen y Quénéhervé 1990), pero en aquellas áreas, donde los bananos se cultivan de manera continua, la rotación de cultivos no puede ser practicada, mientras que al mismo tiempo, el precio de nematocidas químicos a menudo es prohibitivo para los pequeños agricultores. Además, la mayoría de estos nematocidas es altamente tóxicos para el medio ambiente. Aunque la resistencia y tolerancia a los nematodos que ocurren naturalmente, han sido explotadas por largo tiempo para muchos cultivos agrícolas (De Waele 1996), hasta la fecha, este método de manejo de nematodos en los bananos ha sido relativamente desatendida. Y esto sucede a pesar de la evidencia, aunque limitada, de que las fuentes de resistencia y tolerancia a los nematodos se encuentran en la reserva genética de *Musa* (Pinochet 1996, De Waele y Elsen 2002).

El objetivo de estas guías técnicas consiste en estimular el interés en el cribado de bananos para la resistencia y tolerancia a los nematodos y suministrar una metodología experimentada para realizar este cribado. Al comparar los genotipos, podemos clasificarlos como completamente, altamente y moderadamente resistentes, los cuales pueden soportar un nivel de reproducción de nematodos que se califica como ninguno, bajo o intermedio, respectivamente.

Debido a que los programas de investigación a menudo tienen participación limitada de nematólogos capacitados, las guías técnicas se escriben para los nematólogos con poca o ninguna experiencia en el área del cribado respecto a la resistencia y tolerancia de las plantas y para los científicos agrícolas con experiencia limitada en nematología. Aunque los investigadores pueden tener que seleccionar o modificar los métodos de alguna manera, de acuerdo a sus condiciones locales, también se espera que estas guías técnicas promuevan la creación de un nivel de normalización para los futuros esfuerzos en el cribado de bananos para la resistencia y tolerancia a los nematodos.

Cultivares de referencia

Los clones contra los cuales deben ser evaluados los nuevos híbridos mejorados con respecto a su reacción a los nematodos son los siguientes:

Pisang jari buaya	Resistente a <i>Radopholus similis</i>	ITC0312
Yangambi km 5	Resistente a <i>Radopholus similis</i>	ITC1123
Grande naine	Susceptible a <i>Radopholus similis</i>	ITC1256

Genotipos a evaluar

Lista de genotipos a evaluar por su resistencia y tolerancia a varias especies de nematodos.

Pisang jari buaya*	AA	ITC0312
Calcutta 4	AA	ITC0249
Pisang mas	AA-Sucrier	ITC0653
Pisang Ceylan	AAB-Mysore	ITC1441
Cachaco	ABB	ITC0643
Saba	ABB	ITC1138
FHIA-03	híbrido FHIA	ITC0506
FHIA-18	híbrido FHIA	ITC1319
FHIA-23	híbrido FHIA	ITC1265
FHIA-25	híbrido FHIA	ITC1418
TMB2x9128-3	híbrido FHIA	ITC1437
TM3x15108-6 (Pita 16)	híbrido IITA	ITC1417

Los genotipos adicionales sugeridos por el Grupo de trabajo en Nematología de PROMUSA son los siguientes:

Grande naine*	AAA	ITC1256
Yangambi km 5*	AAA	ITC1123
Paka	AA	ITC0320
Selangor	AA	ITC1060
Kunnan	AB (Ney Poovan)	ITC1034
<i>Musa balbisiana</i>	BB (Honduras)	ITC0247
<i>Musa balbisiana</i>	BB (Tani)	ITC1120
Foconah	AAB (Pome-Prata)	ITC0649
Pisang lemak manis	ABB	ITC1183
FHIA-01	híbrido FHIA	ITC0504

* No se aplica cuando se evalúa la resistencia a *R. similis*

INIBAP mantiene un listado de material disponible indizado contra virus, para seleccionar los genotipos de referencia. Por favor comuníquese con el coordinador IMTP en INIBAP. Para la información sobre el manejo del material vegetal, refiérase al Apéndice I.

Establecimiento de las parcelas

Para el cribado en el campo, es necesario tomar muestras del sitio potencial para realizar el experimento, con el fin de determinar el espectro de los nematodos presentes. Idealmente, un sitio debe estar infestado con una sola especie de nematodos fitoparásitos, pero este caso es raro. Se debe seleccionar un sitio donde la composición de las especies es representativa de la región.

El nivel de infestación en el sitio debe ser investigado examinando las raíces de los bananos que crecen en el sitio (Figura 6), y no por medio de muestras del suelo. Si la población presente de nematodos es suficientemente grande (al menos 100

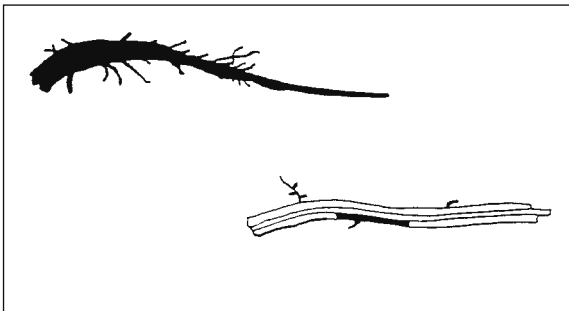


Figura 6. Una raíz muerta (arriba) y una raíz funcional (abajo).

nematodos/g de raíces frescas), el campo infestado puede ser utilizado inmediatamente.

Si la población presente de nematodos es demasiado pequeña, el sitio debe ser plantado con un genotipo de banano que sea un buen hospedero, con el fin de aumentar la población de nematodos, o se puede añadir raíces infectadas con nematodos al sembrar las plantas (utilizando las raíces infectadas maceradas).

Identificación de los nematodos

Generalmente, se puede distinguir tres tipos de nematodos parásitos de las raíces, basándose en su biología:

- Los nematodos ectoparásitos permanecen fuera de la planta. Para alimentarse, perforan las capas celulares externas de la planta con un estilete.
- Los nematodos endoparásitos migratorios invaden los tejidos de las plantas, permanecen migratorios (móviles) y se alimentan de las numerosas células normales dentro de la planta. Ponen huevos individualmente, dentro o fuera de la planta. Los nematodos más dañinos y propagados que atacan los bananos son el nematodo barrenador *Radopholus similis*, los nematodos lesionadores de las raíces *Pratylenchus coffeae* y *P. goodeyi*, y el nematodo de espiral *Helicotylenchus multicinctus*.
- Los nematodos endoparásitos sedentarios también invaden los tejidos de las plantas pero las hembras adultas se vuelven sedentarias (inmóviles) y se alimentan de unas pocas células especiales dentro de la planta. Ponen huevos todos juntos (por ejemplo, en un solo saco) fuera de la planta. Algunos nematodos parásitos de las raíces, endoparásitos sedentarios (*Meloidogyne* spp.), a menudo también se encuentran en las raíces del banano, pero su estatuto como patógenos no está claro. Las especies que se encuentran con mayor frecuencia son *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*.

Es muy importante antes de realizar la evaluación de los nuevos híbridos o clones seleccionados conocer exactamente el tipo de nematodo presente en el sitio. La identificación y preparación de los nematodos para el análisis microscópico se describe en el Apéndice VII.

Diseño experimental

En los experimentos de cribado, la cantidad de réplicas debe variar entre 8 y 15. Dependiendo de las condiciones ambientales, las réplicas estarán arregladas en un diseño completamente aleatorio, diseño de bloques completos al azar o en un diseño de parcela dividida.

Si requiere mayor información o recomendaciones sobre el diseño experimental, por favor comuníquese con Dirk De Waele (correo electrónico: Dirk.DeWaele@agr.kuleuven.ac.be).

Prácticas agronómicas

El experimento deberá manejarse de acuerdo con las prácticas agronómicas locales de la organización colaboradora, y todas las prácticas de manejo deberán aplicarse uniformemente en todo el sitio de experimentación. No se deberán controlar los nematodos. Los experimentos se ejecutarán para el primer y segundo ciclos de cultivo de la planta.

Información a recolectar

La interpretación de los datos obtenidos debe estar basada en una combinación de los datos sobre la reproducción de nematodos y los datos sobre la respuesta de la planta hospedera, incluyendo la cantidad de nematodos en las raíces, el porcentaje de raíces muertas y el índice de necrosis radical.

Sugerimos registrar los datos en las siguientes etapas:

Planta madre

- CP crecimiento precoz de la planta, de 10 a 12 semanas después de la plantación
- RF planta recién floreada (menos de 14 días) o planta con flores en emergencia
- C a la cosecha.

Hijo

- FRPM en la etapa de floración reciente de la planta madre
- CPM durante la cosecha de la planta madre

Evolución de la enfermedad

Evaluación de la reproducción de nematodos

Los adultos y jóvenes de los nematodos endoparásitos migratorios (incluyendo *H. multicinctus*) y los adultos y jóvenes de los nematodos noduladores de las raíces pueden ser extraídos de las raíces del banano aplicando diversos métodos. Dos de estos métodos, el método embudo/plato de maceración de Baermann y el método de maceración-cernido, son descritos en Apéndice VIII. La ventaja de estos métodos es que requieren poco equipo. En los experimentos de cribado en campo, se puede utilizar la cantidad de jóvenes en combinación con el cálculo de la tasa

de agallas en las raíces (Kinloch 1990). En el campo, la población de nematodos puede ser expresada sólo por unidad de raíz.

Evaluación de daños

El daño ocasionado a las plantas de una mata puede ser evaluado midiendo los daños a las raíces, así como el crecimiento y el rendimiento de la planta. Porque el desarrollo y la decadencia de las raíces son procesos dinámicos, dependientes del genotipo, influenciados por el crecimiento de la planta y la senescencia natural por un lado, y la decadencia causada por factores abióticos y bióticos (incluyendo el daño ocasionado por nematodos) por otro, una etapa de desarrollo de la planta específica debe ser seleccionada como etapa estándar para comparación de la sensibilidad de diferentes genotipos o un genotipo cultivado bajo diferentes condiciones. Seleccionar la etapa de la planta en que está recién floreada como una etapa estándar tiene la ventaja de que, en esta etapa, la planta ha producido su cantidad máxima de raíces y ya no se formarán raíces nuevas. También, a partir de esta etapa, la altura de la planta permanecerá constante hasta la cosecha. Las plantas también pueden ser seleccionadas basándose en la edad, altura y posición en la mata.

Debido a que los daños ocasionados a las raíces de un retoño pueden ser relacionados con su altura y circunferencia, así como con el tamaño y peso del racimo de la planta madre recién cosechada, se puede realizar la evaluación de los daños ocasionados a los retoños. Esto es especialmente relevante en las regiones donde las altas poblaciones de nematodos están asociadas con las raíces de los bananos, habiendo una cantidad insuficiente de raíces en las plantas cosechadas para realizar la evaluación del daño. Observar los daños en los retoños tiene la ventaja adicional de poder realizar una estimación de la cantidad de raíces producidas hace algún tiempo, pero que ya están completamente descompuestas, relacionando la cantidad de las bases radicales a la cantidad de las raíces muertas y funcionales.

La extensión de los daños ocasionados a las raíces y al cormo de una planta es una medida de la salud de un sistema radical y del cormo; tanto menor es el daño, cuanto más saludables son las raíces y el cormo.

En principio, el daño ocasionado a las raíces y cormo consiste de los siguientes componentes:

- raíces muertas
- y necrosis radical de las raíces funcionales.

Las raíces muertas están completamente podridas o secas; las raíces funcionales muestran al menos algunos tejidos sanos. La extensión de los daños puede ser expresada como el porcentaje de raíces muertas, porcentaje de necrosis radical y porcentaje de bases radicales con lesiones. El Apéndice IX incluye el protocolo para evaluar los daños ocasionados por los nematodos. La tabla 3 indica cuando los datos deben ser recopilados. Utilice el formulario de campo 5 en el Apéndice X para registrar los datos.

Características agronómicas

Por favor refiérase a la página 13 donde se encuentra una lista completa de variables a evaluar. La tabla 3 indica cuando los datos deben ser recopilados. Utilice los formularios de campo 6 en el Apéndice XI para registrar los datos.

Tabla 3. Programa para el registro de la evolución de la enfermedad y de los datos agronómicos.

Tipo de datos	Planta madre			Hijo	
	CP	RF	C	FRPM	CPM
Datos de evolución de la enfermedad					
Evaluación de la reproducción	X	X	X	X	X
Evaluación de daños	X	X	X	X	X
Información agronómica					
Tiempo de la siembra a la parición	a la floración				
Altura del pseudotallo	a la floración				
Altura del hijo	a la floración				
Número de hojas funcionales	a la floración		X	X	X
Ciclo de cultivo			X		
Circunferencia del pseudotallo			X		
Peso del racimo			X		
Número de manos en el racimo			X		
Características de los dedos			X		
Número de frutos			X		
Peso promedio de los frutos			X		

Planta madre

CP crecimiento precoz de la planta, de 10 a 12 semanas después de la plantación
 RF planta recién floreada (menos de 14 días) o planta con flores en emergencia
 C a la cosecha.

Hijo

FRPM en la etapa de floración reciente de la planta madre
 CPM durante la cosecha de la planta madre.

Información ambiental

Esta información se deberá coleccionar en la estación meteorológica más cercana al experimento. Las lecturas deberán realizarse lo más temprano posible cada mañana y siempre a la misma hora. El formulario de campo 7 para recolectar esta información se encuentra en el Apéndice XI.

Prácticas de manejo

Se deberán anotar los datos sobre aplicaciones de fertilizantes, medidas de control de nemátodos/picudos y manejo de la irrigación/drenaje.

Apéndices

Apéndice I. Manipulación del material vegetal

El Centro de Tránsito (ITC) de INIBAP proveerá los clones, preferiblemente en forma de cultivo de tejidos proliferantes, a los laboratorios con infraestructura necesaria para el cultivo de tejidos. Los colaboradores en estos sitios de evaluación, tendrán la responsabilidad de producir plántulas para utilizarlas en los ensayos. Si los beneficiarios no tienen las facilidades para cultivo de tejidos, se les enviarán plántulas enraizadas provenientes del cultivo de tejidos. En ambos casos, las plántulas deberán mantenerse en bolsas o macetas de plástico con suelo pasteurizado o con una mezcla para enraizamiento.

Cultivo de tejidos proliferantes

El ITC envía los cultivos de yemas apicales proliferantes en frascos de poliestireno transparente, esterilizados y sellados con una tapa de rosca. Los cultivos se envían en un medio de crecimiento semisólido. Tan pronto llegan a su destino, deben ser subcultivados en un medio fresco.

Los cultivos de yemas apicales proliferantes se puede seguir subcultivando en un medio de crecimiento apropiado y así multiplicar y regenerar más plántulas enraizadas (adecuadas para transferir al suelo). La adición de niveles relativamente altos de citoquinina en el medio tiende a estimular la formación de yemas y brotes múltiples mientras que el desarrollo de plantas individuales es inducido al transferir los propágulos a un medio sin o con muy bajas concentraciones de citoquinina.

La composición de los medios empleados para la micropropagación de *Musa* en el Centro de Tránsito de INIBAP se describe en la tabla 1.

Nota: Se deben mantener condiciones asépticas durante todo el proceso de manipulación de los cultivos.

Tabla 1. Composición del medio nutritivo Murashige y Skoog modificado, que se utiliza en el Centro de Tránsito de INIBAP para la propagación *in vitro* de bananos y plátanos.

		mg/L
Macro nutrientes	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
	KH ₂ HPO ₄	400
Micro nutrientes	H ₃ BO ₃	6.18
	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60
	KI	0.83
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.24
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.024
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025

Tabla 1. (cont.)

		mg/L
Hierro	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80
	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	37.22
Vitaminas		
	Glycine	2.00
	Chlorhidrato de Thiamina	0.10
	Acide nicotínico	0.50
	Chlorhidrato de Piridoxina	0.50
Antioxidante	Acido ascórbico	10.00
Fuente de carbón	Sucrosa	30000
Agente gelificante	Gelrite® o Agar	2000 8000
Reguladores de crecimiento	N ⁶ -benzilaminopurina	2.25*
		0.225**
	Acido indol-3-acético	0.175

Ajuste el pH del medio a 5.8 antes de autoclavar.

* para multiplicación

** para regeneración.

Multiplicación

El número deseado de propágulos en proliferación se puede obtener a través de varios subcultivos utilizando el siguiente procedimiento:

- Destape el tubo del cultivo y flamee el borde durante unos cuantos segundos,
- Saque con cuidado el grupo de ápices y brotes del tubo,
- Separe el material en pequeños grupos de 2 ó 3 micro-ápices y/o brotes,
- Recorte el tejido superfluo del cormo y cualquier tejido ennegrecido. Reduzca los ápices a un tamaño de 5 a 7 mm de alto,
- Transfiera cada grupo de ápices o brotes recortados a un medio fresco de multiplicación esterilizado previamente,
- Incube los cultivos a una temperatura de 28 ± 2°C con una intensidad de luz de 1000-3000 lux, y un fotoperíodo de 16 horas,
- Este procedimiento se puede repetir después de 4 a 6 semanas, cuando se produzcan nuevos ápices o brotes laterales.

Nota: El índice de multiplicación depende del genotipo del cultivar y está influenciado por la composición del medio (particularmente la citoquinina), el tamaño del explante y la edad del cultivo.

Regeneración

El propósito de este paso es producir plántulas individuales enraizadas para su establecimiento en suelo.

- Destape el tubo del cultivo y flamee el borde durante unos segundos,
- Saque con cuidado el grupo de ápices o brotes del frasco,
- Subdivida los grupos proliferados en ápices individuales,
- Elimine el tejido superfluo del cormo y tejido ennegrecido. Recorte la parte superior de los ápices hasta dejarlos de 10 mm de alto,
- Coloque cada ápice recortado en un medio de regeneración fresco esterilizado previamente para inducir el alargamiento del ápice y promover el crecimiento de las raíces,
- Los cultivos deben mantenerse a una temperatura ambiente de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con un ciclo de luz de 12 a 16 horas. Se recomienda una alta intensidad de luz, entre 5000 y 10 000 lux,
- Si surgen nuevos ápices o brotes laterales, repita el subcultivo hasta que obtenga ápices individuales enraizados,
- Mantenga en cultivo los ápices enraizados de 4 a 6 semanas,
- Las plantas *in vitro* que tengan de 5 a 10 cm de altura, con al menos cuatro hojas y un sistema radical bien desarrollado están listas para su traslado al suelo.

Manipulación de las plántulas enraizadas *in vitro*

Las vitropántulas enraizadas se distribuyen como cultivos estériles, en un medio de endurecimiento en bolsas herméticas Cultu saks®.

Las plántulas que tienen entre 5-10 cm de altura y raíces bien desarrolladas, se puede sembrar en macetas. Si las plántulas son más pequeñas o si no se puede trasplantarlas inmediatamente, se aconseja colocarlas en las bolsas Cultu sak® en posición vertical, en un lugar donde reciban suficiente luz (no directamente del sol), y a una temperatura entre 20 y 30°C. Bajo estas condiciones las plántulas pueden ser mantenidas en buen estado por varias semanas.

El trasplante de las plántulas enraizadas al suelo requiere cuidado. Se recomienda utilizar el método que se presenta a continuación o su propio método validado:

- Abra cada bolsa Cultu sak® cortando uno de los bordes verticales,
- Con mucho cuidado, saque la plántula de la bolsa, sostenga la base cuidadosamente con unas tenazas sin filo. Coloque la plántula en la palma de su mano,
- Remueva el medio de cultivo adherido a las raíces y hojas, colocando la plántula en un recipiente (balde) con agua y sacudiéndola suavemente. Tenga cuidado de no dañar el tallo ni el sistema radical,
- Trasplante la plántula a macetas de plástico o a bolsas (15 cm de diámetro) con una mezcla pasteurizada 30:70 turba:arena, cuyos 2 a 3 cm superiores estén tami-

zados finamente. Las raíces superiores deben cubrirse con 2-3 cm de suelo,

- Riegue las plántulas inmediatamente después de trasplantarlas,
 - Mantenga las plantas en una atmósfera de alta humedad:
 - Se puede construir una cámara sencilla de humedad colocando un marco de madera dentro de un plástico transparente fuerte. La cámara de humedad (de aproximadamente 40-60 cm de altura) se coloca sobre las macetas en un lugar sombreado donde la temperatura se mantenga entre 25 y 32°C.
 - Para mantener la humedad dentro de la cámara es necesario rociar regularmente con agua para saturar el aire. El calor que se concentra dentro de la cámara disminuye si se deja una abertura de 2 a 3 cm en la base para que el aire circule.
 - Durante la primera semana después del trasplante, rocíe la cámara dos veces al día para saturar la atmósfera. Este paso es muy importante pues una humedad relativa baja en esta etapa destruiría fácilmente las plántulas. Riegue las plantas una vez al día con un poquito de agua corriente.
 - Una semana después del trasplante, rocíe la cámara húmeda y las plantas una vez al día.
 - Un mes después del trasplante, saque las plantas de la cámara de humedad,
 - Mantenga las plántulas en un invernadero, sobre una superficie alta (no directamente en el suelo) y bajo sombra, hasta que alcancen aproximadamente 30 cm de altura (2-3 meses antes de su establecimiento en el campo),
 - Podría ser necesario pasar las plantas a macetas más grandes,
 - Lleve las plantas al campo durante la estación lluviosa, máximo seis semanas antes de que empiece la estación seca.
-

Apéndice II. Cómo aislar muestras de *Fusarium* para analizar el grupo de compatibilidad vegetativo

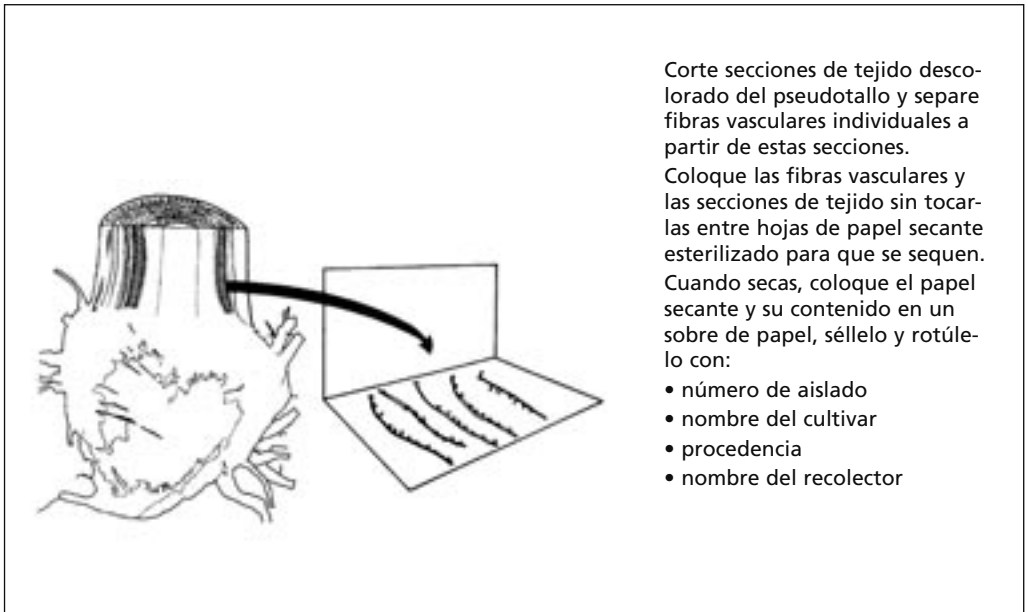


Figura 1. Pasos a seguir para la preparación de muestras de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* para su envío (cortesía del Dr. Ken Pegg, QDPI).

Las muestras de tejido del pseudotallo o del cormo de plantas enfermas deberán ser preparadas y enviadas a un laboratorio especializado para su análisis.

Si todas las plantas de una introducción están infectadas, muestre al azar entre 4 y 5 plantas para su análisis. Si únicamente unas cuantas plantas están afectadas, deberá muestrearlas todas para su análisis. Se deben preparar 8 cortes por planta.

Se puede disminuir la pérdida de viabilidad de las muestras si se preparan rápidamente después de su recolección y se envían inmediatamente después de que los cortes estén secos (aproximadamente tres días en papel secante esterilizado).

Para enviar las muestras utilice sobres de papel pues el plástico hace que las muestras suden y promueve el crecimiento de contaminantes bacterianos. Recuerde que para mantener la viabilidad del hongo dentro de los cortes vasculares debe evitar que éstos estén muy calientes, muy fríos o muy húmedos. Las muestras deberán mantenerse todo el tiempo en papel y secarse sobre una superficie, bajo condiciones normales de laboratorio, **no en hornos**.

(Protocolo cortesía de la Dra Natalie Moore, QDPI, Australia)

Apéndice IV. Identificación de los patógenos

Mycosphaerella

Los tres patógenos, *Mycosphaerella fijiensis* (anamorfo *Paracercospora fijiensis*), *M. musicola* (anamorfo *Pseudocercospora musae*) y *M. eumusae* (anamorfo *Pseudocercospora eumusae*), son los agentes causales de la raya negra de la hoja (Sigatoka negra), enfermedad de Sigatoka (Sigatoka amarilla) y mancha foliar eumusae, respectivamente (Jones 2000, Crous & Mourichon 2002). Estos patógenos no solo son difíciles de distinguir basándose en la expresión de los síntomas (láminas de 1 a 6 p. 40), sino que sus estados sexuales (teleomorfos) también son similares. Sin embargo, las especies pueden ser identificadas basándose en las diferencias morfológicas (láminas de 7 a 12 p. 41) entre sus estados asexuales (anamorfos) independientemente de si son observadas directamente en las hojas enfermas o después de aislarlas. Las características morfológicas de los tres patógenos se presentan en la tabla 2. Se debe tomar precauciones para no confundir estos patógenos con otras especies fungosas que también atacan el follaje de los bananos (Jones 2000, Wardlaw 1972).

Tabla 2. Características morfológicas de los estados anamorfos de *Mycosphaerella*

Especie (estado anamorfo)	Conidióforos	Conidios
<i>Paracercospora fijiensis</i>	<p>(Lámina 7) Primera aparición en la etapa de primeras rayas [Etapas de Fouré de 2 a 3 (Fouré 1982)]</p> <p>Principalmente la superficie inferior de la hoja</p> <p>Emergen individualmente o en pequeños grupos (de 2 a 6), esporodoquios y estromas ausentes</p> <p>Rectos o geniculados, color de pálido a ligeramente marrón, con 0-5 septos, ocasionalmente ramificados, cicatrices en las esporas ligeramente engrosados (entre 16.5 y 62.5 x 4 a 7 µm)</p>	<p>(Lámina 8) De obclavados a cilíndrico-obclavados, rectos o curvados, de de hialinos a oliváceos muy pálidos, con número de septos de 1 a 10, con un hilo basal distintivo (cicatriz)</p> <p>Entre 30 y 132 x 2.5 y 5 µm</p>
<i>Pseudocercospora musae</i>	<p>(Lámina 9) Primera aparición en la etapa de mancha (Etapa 4 de Brun)</p> <p>Abundante en ambas superficies foliares</p> <p>En fascículos (esporodoquios) densos en estromas oscuros</p> <p>Rectos, hialinos, la mayoría no son septados, ni geniculados, sin cicatrices en las esporas (entre 5 y 25 x 2 y 5 µm)</p>	<p>(Lámina 10) De obclavados a cilíndrico-obclavados, obclavados, rectos o curvados, de pálidos a oliváceos muy pálidos, con número de septos de 0 a 8, sin un hilo basal distintivo</p> <p>Entre 10 y 109 x 2 y 6 µm</p>

Tabla 2. (cont.)

Especie (estado anamorfo)	Conidióforos	Conidios
<i>Pseudocercospora eumusae</i>	(Lámina 11) Primera aparición en la etapa de mancha Principalmente en la superficie superior de la hoja En forma de pera, sumergidos, más o menos errumpentes, ostiolados cuando jóvenes, pero cuando maduros a menudo se ven como acérvulos (de 31 a 42 μm)	(Lámina 12) Fusiformes, hialinos, cilíndricos y curvados, con 3 a 5 septos Entre 21.2 y 41.6 x 2.5 μm

Adaptado de Wardlaw 1972, Carlier et al. 2000, Crous y Mourichon 2002.

El procedimiento para aislar los patógenos es explicado adelante e ilustrado en la Figura 2.

1. Muestreo del tejido enfermo

Para realizar observaciones microscópicas *in situ*, los especímenes deben provenir de las hojas en las etapas tempranas de aparición de rayas para *P. fijiensis* (lámina 1), y de manchas para *P. musae* (lámina 3) y *P. eumusae* (lámina 5). Para el aislamiento de los hongos y para realizar las observaciones microscópicas *in vitro*, los especímenes deben provenir de las hojas completamente necrosadas para cualesquiera de las especies (láminas 2, 4 y 6). La hoja debe ser secada cuidadosamente entre las láminas de papel periódico.

2 y 3. Aclaración del tejido y observaciones microscópicas *in situ*

Las lesiones se aclaran en una solución de KOH al 10% durante la noche y se lavan cinco veces en agua durante 10 minutos cada vez. Luego, los conidióforos asociados con estas lesiones pueden ser observados directamente en el portaobjetos sin teñirlas. Para observar a los conidios, los tejidos aclarados se tiñen por 1 minuto con una solución de "blue cotton" al 0.5% y 1:1 de ácido láctico y glicerol, y luego lavados en agua.

4 y 5. Descarga de ascósporas y clonación

Las hojas necrosadas de banano se secan a temperatura ambiente durante 48 horas y luego se remojan en agua destilada por 15 minutos. Las secciones de las hojas se aseguran a la parte baja de las tapas de los platos Petri que contienen agua con agar al 3%. Las ascósporas se descargarán durante la noche sobre la superficie de agar (las ascósporas de las tres especies de *Mycosphaerella* tienen dos células y miden entre 12 y 18 μm x 2.5 hasta 4.5 μm), cada ascóspora individual se transfiere al medio PDA fresco a la mañana siguiente. Si no se obtienen ascósporas, pedazos de hojas pueden ser incubados durante 48 horas sobre un papel de filtrado húmedo en un plato Petri, remojadas en agua destilada durante 5 minutos y luego transferidas sobre las tapas de los platos Petri tal como se describe arriba. Los cultivos se incuban a 25°C.

6 y 7. Esporulación in vitro y observaciones microscópicas de los conidios

La esporulación de los conidios es inducida al cultivar pedacitos del micelio en un medio V8 modificado (100 ml de V8, 0.2 g de CaCO_3 , 20 g de agar por litro de medio, pH 6). Los cultivos se incuban a 20°C por 10 a 14 días bajo la luz fluorescente blanca fría y continua de 60 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Luego los cultivos se raspan con un escalpelo y los conidios se suspenden en una solución de "blue cotton" directamente en el portaobjetos para la observación microscópica.

8. Conservación

Los fragmentos del micelio de las colonias en desarrollo se colocan en glicerol al 15%, se mantienen por 2 horas a 4°C y luego se transfieren a un congelador para el almacenamiento a largo plazo a -80°C.

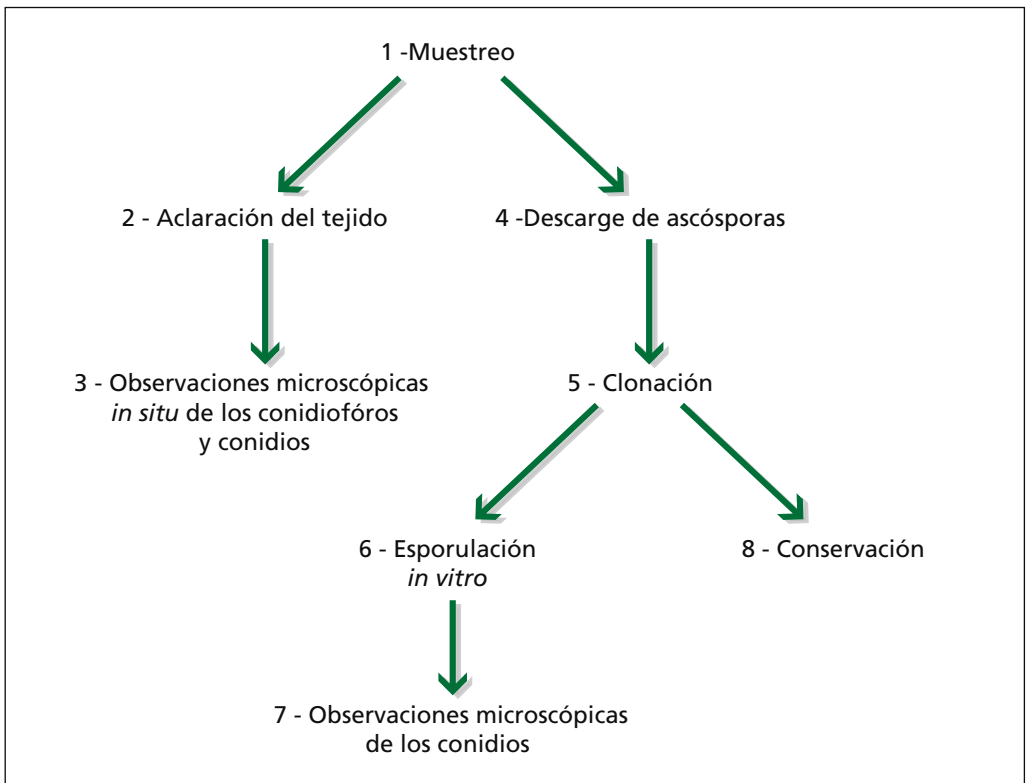
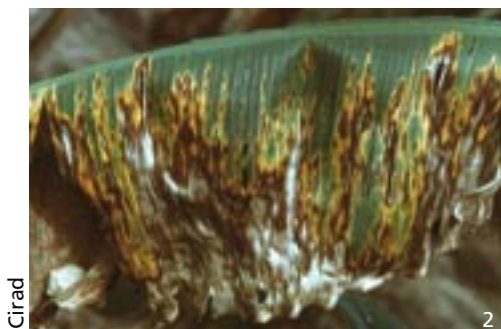


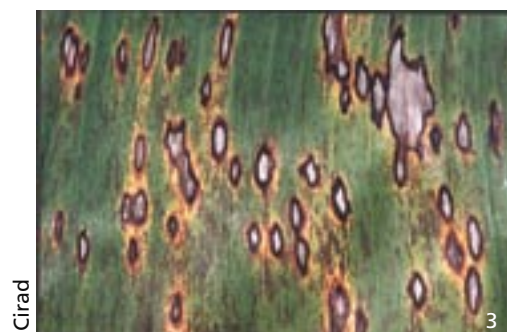
Figura 2. Diagrama de flujo para la identificación de la mancha foliar causada por los patógenos de *Mycosphaerella*.

(Protocolo cortesía de Marie Françoise Zapater, Jean Carlier y Xavier Mourichon. CIRAD, TA 40/02, avenue d'Agropolis, 34398, Montpellier; jean.carlier@cirad.fr).

Láminas 1-6: Síntomas foliares.



Enfermedad de la raya negra de la hoja
(*Mycosphaerella fijiensis*).



Enfermedad de Sigatoka
(*Mycosphaerella musicola*).



Enfermedad de la mancha foliar *eumusae*
(*Mycosphaerella eumusae*).

Láminas 7-12: Anamorfos de los patógenos de las manchas foliares de los bananos.

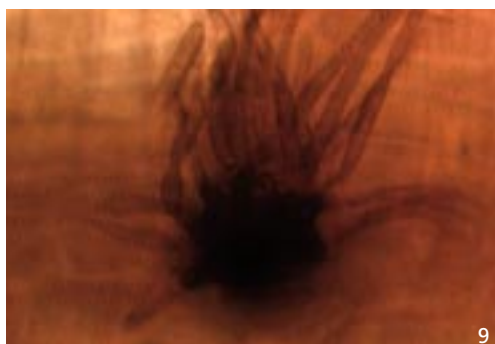
Conidióforos



Conidios



Enfermedad de la raya negra de la hoja (*Paracercospora fijiensis*).

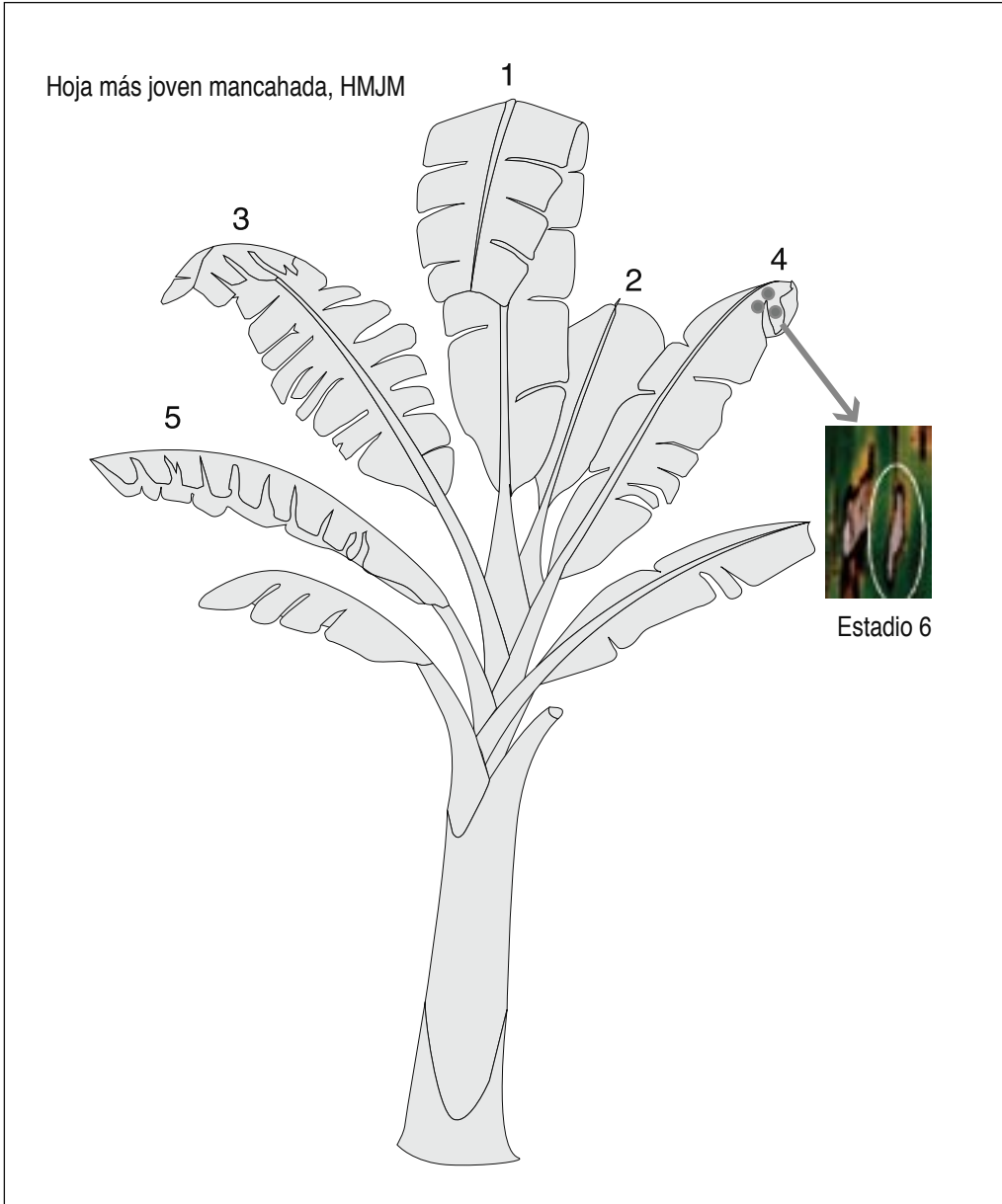


Enfermedad de Sigatoka (*Pseudocercospora musae*).



Enfermedad de la mancha foliar eumusae (*Pseudocercospora eumusae*).

Apéndice V. La hoja más joven manchada.



HMJM = La primera hoja que presenta 10 ó más lesiones distintas necrosadas y maduras.

Apéndice VII. Identificación y preparación de los nematodos endoparásitos

Las especies de nematodos endoparásitos migratorios pueden ser identificadas sobre la base de una combinación de caracteres morfológicos. Las características más importantes que las distinguen, se describen en la tabla 3 y las figuras 3 a 5.

El dimorfismo sexual con respecto a la forma de la región de la cabeza sólo está presente en *Radopholus similis*: en especímenes hembras, la región de la cabeza es baja, hemisférica, continua o ligeramente sobresalida con fuerte esclerotización cefálica y un estilete; en especímenes machos, la región de la cabeza es alta, a

Tabla 3. Características morfológicas de los nematodos endoparásitos migratorios de banano.

Características	<i>R. similis</i>	<i>P. coffeae</i>	<i>P. goodeyi</i>	<i>H. multincinctus</i>
Ocurrencia de especímenes machos	más bien rara	común	común	común
Posición de la vulva	media, a 50-60% del largo del cuerpo	en la parte posterior, a 70-80 % del largo del cuerpo	en la parte posterior, a 70-80 % del llargo del cuerpo	en la parte posterior, a 60-70 % del largo del cuerpo
Número de ramificaciones genitales en hembras	2 desarrolladas igualmente	sólo la ramificación anterior es desarrollada	sólo la ramificación anterior es desarrollada	2 cortas , desarrolladas igualmente, algo cilíndricas
Forma de la cola en las hembras	algo alargada-conoidal con una terminación redondeada o endentada	conoidal, cóncava en la parte inferior, terminación ampliamente redondeada, truncada o irregularmente endentada	conoidal, cóncava en la parte inferior, contorno dorsal sinuado casi en la punta de la cola	terminación anular hemisférica, usualmente con mayor curvatura en la parte dorsal, que abdominal
Forma de la cola de los machos	alargada, conoidal, arqueada en la parte interior, con bolsa que se extiende por más de 2/3 del largo de la cola	convexa, conoidal, con bolsa que se extiende hasta la punta de la cola	convexa, conoidal, con bolsa que se extiende hasta la punta de la cola	corta, con una proyección ventral en forma de dedo, bolsa se extiende hasta la punta de la cola

menudo en forma de una protuberancia, más sobresalida con una débil esclerotización y un estilete degenerado.

Helicotylenchus multincinctus puede ser diferenciado de otras especies en una etapa posterior, ya que los cuerpos tanto de especímenes hembras, como de machos tienen anulares distintos a los de otras especies, y al matarlos y fijarlos, ellos se arquean y toman la forma de la letra C.

Las descripciones completas de *R. similis* se puede encontrar en Orton Williams y Siddiqi (1973), de *Pratylenchus coffeae* en Siddiqi (1972), de *P. goodeyi* en Machon y Hunt (1985) y de *H. multincinctus* en Siddiqi (1973).

Las hembras de *Meloidogyne* spp. son sedentarias (el cuerpo esférico con un cuello

delgado), mientras que los machos y los especímenes jóvenes son en forma de gusanos. Los machos son raros; la región de la cabeza es alta, en forma de cono, no sobresalida, con anulares claros; la esclerotización cefálica y el estilete son fuertes; la cola es corta, hemisférica, la bolsa ausente. La forma de la cabeza de los especímenes jóvenes es similar a la de los machos; la esclerotización cefálica débil; la cola puntiaguda.

Debido a la extensa variación morfológica entre y dentro de *Meloidogyne* spp. y la existencia de razas de plantas hospederas, la identificación precisa de estos nematodos es difícil. Las guías para la preparación de los patrones perineales de las hembras para la observación en el microscopio de luz y para conducir la prueba diferencial de las plantas hospederas, se puede encontrar en Hartman y Sasser (1985). Una clave pictórica y una caracterización completa de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*, se encuentran en Eisenback *et al.* (1981). Finalmente, se puede utilizar la electroforesis basada en la técnica de placa delgada para la coloración de geles poliacrilamídicos e isozimas (esterasa y malate dehidrogenasa) con el fin de identificar los especímenes de *Meloidogyne* spp. más comunes (Esbenshade y Triantaphyllou 1985).

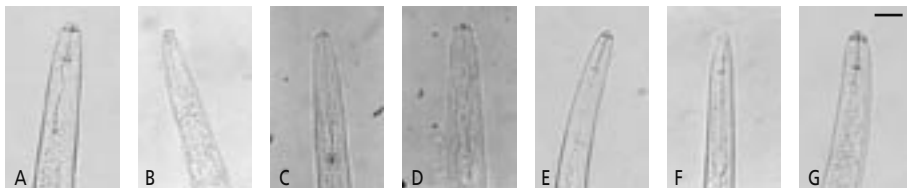


Figura 3. Región de la cabeza de *Radopholus similis* (A: hembra; B: macho), hembra de *Pratylenchus coffeae* (C), hembra de *Pratylenchus goodeyi* (D), hembra de *Helicotylenchus* (E) y *Meloidogyne* (F: 4ª etapa juvenil; G: macho). Barra = 20 micrones.

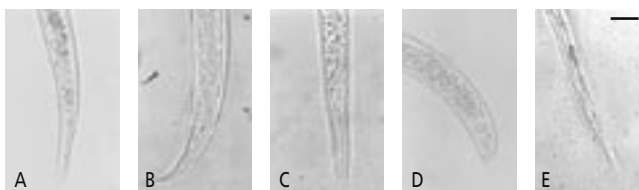


Figura 4. Región de la cola de una hembra de *Radopholus similis* (A), hembra de *Pratylenchus coffeae* (B), *Pratylenchus goodeyi* (C), *Helicotylenchus multicinctus* (D) y de los especímenes en la 4ª etapa juvenil de *Meloidogyne incognita* (E). Barra = 20 micrones.

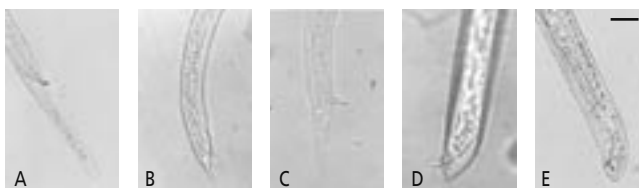


Figura 5. Región de la cola de un macho de *Radopholus similis* (A), *Pratylenchus coffeae* (B), *Pratylenchus goodeyi* (C), *Helicotylenchus multicinctus* (D), *Meloidogyne incognita* (E). Barra = 20 micrones.

Protocolo 1. Preparación de los nematodos para su identificación con un microscopio de luz

Es esencial que las poblaciones de nematodos utilizadas para la selección sean identificadas con precisión a nivel de especie.

Este protocolo describe un método rutinario, mediante el cual se preparan todos los nematodos para la observación con un microscopio de luz. Se puede obtener buenos resultados, si los nematodos se matan rápidamente y se fijan mediante un proceso con formaldehído caliente (Seinhorst 1966), se transfieren al glicerol mediante el método etanol-glicerol (Seinhorst 1959) y se montan sobre las placas de vidrio utilizando el método de anillo de cera (Maeseneer y d'Herde 1963). Estas placas de vidrio pueden ser almacenadas permanentemente, y los nematodos, conservados y utilizados como especímenes de referencia.

Este método rutinario no es adecuado para la preparación de las hembras de los nematodos parásitos de las raíces (*Meloidogyne* spp.). En Hartman y Sasser (1985), puede encontrarse un método para la preparación de los patrones perineales de las hembras de los nematodos parásitos para su observación con el microscopio de luz.

1. Fijación de los nematodos

- concentrar la mayor cantidad de nematodos en una gota de agua muy pequeña en un recipiente de vidrio cóncavo (por ejemplo, un bloque de vidrio para colorear de 4 x 4 x 1.5 cm),
- hervir el mismo volumen de formaldehído al 8%,
- añadir el formaldehído al 8% caliente tan pronto como sea posible a la gota de agua que contiene los nematodos (concentración resultante de formaldehído: 4%).

2. Transferencia de los nematodos del formaldehído al etanol

- preparar la solución I (formaldehído al 4% + 1 gota de glicerol/100 ml),
- llenar un bloque de vidrio con la solución I,
- transferir los nematodos con una aguja del formaldehído al 4% a la solución I en el bloque de vidrio,
- llenar un recipiente de vidrio cerrado (por ejemplo, un disecador) de una profundidad aproximada de 1 cm, con etanol al 95%,
- colocar el bloque de vidrio sobre un soporte en el disecador para que quede sobre la capa de etanol,
- cerrar el disecador apretadamente,
- colocar el disecador en una incubadora a 35°C por una noche.

3. Transferencia de los nematodos del etanol al glicerol

- sacar el bloque de vidrio del disecador (el etanol reemplazará el formaldehído al 4%),

- cubrir el bloque de vidrio parcialmente con una tapa de vidrio,
- colocar el bloque de vidrio en una incubadora a 35°C,
- revisar después de 15-20 minutos si el etanol se ha evaporado. Cuando esto suceda, añadir unas cuantas gotas de solución II (etanol al 95% + 2 gotas de glicerol/100 ml),
- repetir el proceso varias veces hasta que etanol se evapore,
- añadir unas pocas gotas de glicerol (suficiente para sumergir los nematodos).

4. Preparación de las placas de vidrio

- calentar la punta de un tubo de cobre de 1.5 cm de diámetro sobre una llama,
 - sumergir la punta caliente en cera de parafina,
 - cuando la cera de parafina se haya fundido, presionar la punta sobre una placa de vidrio haciendo un anillo de cera que se solidificará prontamente,
 - colocar una pequeña gota de glicerol en el medio del anillo de cera,
 - transferir los nematodos con una aguja y colocarlos en el centro de la gota de glicerol (10 nematodos/gota de glicerol),
 - cubrir con una tapa de vidrio,
 - colocar la placa de vidrio sobre un plato caliente por unos segundos (el anillo de cera se fundirá permitiendo que la tapa de vidrio se asiente, confinando de este modo el glicerol al centro del anillo,
 - colocar la placa de vidrio sobre una superficie fría (el anillo de cera se solidificará prontamente),
 - sellar la tapa de vidrio (por ejemplo, con esmalte de uñas).
-

Apéndice VIII. Protocolos para la evaluación de la reproducción de nematodos

Protocolo 2. Estimación de la tasa de reproducción de los nematodos endoparásitos migratorios

1. Determinación del peso fresco de las raíces

Durante la recolección de raíces en el campo, recoja todas las raíces de una excavación tamaño estándar de 20 x 20 x 20 cm, la cual se extiende desde el cormo de la planta hacia afuera (Figura 6). Recoja sólo las raíces de la planta seleccionada; no incluya raíces de plantas adyacentes. En el caso de una planta joven, a menudo es más fácil remover el retoño completo de la mata (Figura 7).

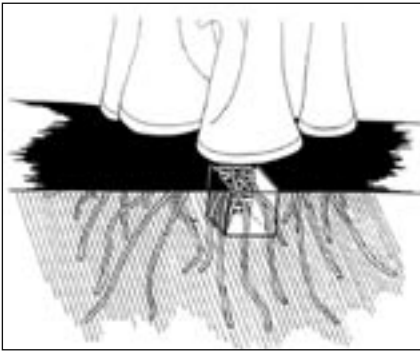


Figura 6. Recolección de raíces de una excavación estándar de 20 x 20 x 20 cm, la cual se extiende desde el cormo de la planta de banano hacia afuera.



Figura 7. Remoción de un retoño de la mata.

Las raíces deben ser removidas en una etapa de crecimiento específica de la planta (STG). Las etapas son:

- CP crecimiento precoz de la planta, de 10 a 12 semanas después de la plantación
- RF planta recién floreada (menos de 14 días) o planta con flores en emergencia
- C a la cosecha.

En las plantas con menos de 14 días (RF) de floración, las brácteas de color blanco o rosado en los dedos del racimo no están secas todavía.

- remover la planta (de macetas/bolsas plásticas) o las raíces (en el campo) del suelo,
- lavar cuidadosamente la tierra de las raíces con agua corriente,

- cortar las raíces en pedazos de 10 cm de largo y secarlas con el papel tisú,
- si todo el sistema radical fue removido: determinar el peso fresco total de las raíces,
- cortar las raíces en pedazos de 1 cm,
- tomar una muestra de 15 g,
- añadir 100 ml de agua destilada y almacenar las raíces en el refrigerador a 4°C.

2. Extracción de nematodos

- colocar las raíces en una licuadora de cocina con 100 ml de agua destilada,
- macerar las raíces 3 veces por 10 segundos (separados por intervalos de 5 segundos),
- pasar la suspensión macerada a través de coladores de 250-106-40 μm y enjuagar los coladores con agua corriente,
- recolectar los nematodos del colador de 40 μm en un recipiente con agua destilada.

3. Evaluación de la población de nematodos

- diluir la suspensión de nematodos con agua destilada en un cilindro graduado a 200 ml,
 - soplar aire a través de la suspensión de nematodos con una pipeta (para homogeneizar la suspensión),
 - tomar una submuestra de 6 ml (en el plato de conteo) o 2 ml (en la placa de conteo),
 - contar los nematodos en el plato de conteo (microscopio estéreo) o en la placa de conteo (microscopio de luz),
 - calcular la población final de nematodos por unidad de raíz y por sistema radical.
-

Protocolo 3. Estimación de la tasa de reproducción de los nematodos noduladores de las raíces

1. Evaluación del peso fresco de las raíces

- remover las raíces (campo) del suelo,
- lavar cuidadosamente la tierra de las raíces con agua corriente,
- cortar las raíces en pedazos de 10 cm de largo y secarlas con papel tisú,
- si todo el sistema radical fue removido: determinar el peso fresco total de las raíces,
- cortar las raíces en pedazos de 1 cm,
- tomar una muestra de 5 g,
- añadir 100 ml de agua destilada y almacenar las raíces en el refrigerador a 4°C.

2. Evaluación de la cantidad de hembras ponedoras de huevos (HPH)

- colorear las masas de huevos sumergiendo las raíces en 0.15 g/L de floxina B por 15 minutos,
- contar la cantidad de hembras ponedoras de huevos (microscopio estéreo),
 - 0: no existen masas de huevos
 - 1: 1-2 masas de huevos
 - 2: 3-10 masas de huevos
 - 3: 11-30 masas de huevos
 - 4: 31-100 masas de huevos
 - 5: > 100 masas de huevos.

3. Evaluación de agallas en las raíces

- estimar las agallas en las raíces:
 - 0: no existen agallas
 - 1: trazos de infecciones con pocas agallas pequeñas
 - 2: < 25% de las raíces con agallas
 - 3: 25-50% de las raíces con agallas
 - 4: 50-75% de las raíces con agallas
 - 5: > 75% de las raíces con agallas.
-

Apéndice IX. Protocolo para la evaluación de los daños ocasionados por los nematodos

Protocolo 4. Evaluación de los daños a las raíces

Evaluar los daños ocasionados a las raíces preferentemente con respecto a una etapa específica del desarrollo de la planta. Las etapas específicas del desarrollo de la planta son:

- CP crecimiento precoz de la planta, de 10 a 12 semanas después de la plantación
- RF planta recién floreada (menos de 14 días) o planta con flores en emergencia
- C a la cosecha.

En plantas que han floreado por menos de 14 días (RF), las brácteas de color blanco o rosado en los dedos del racimo todavía no se han secado. Registre con exactitud la mata y el número de planta de la muestra. En adición a la etapa de la planta, también anote el genotipo, la circunferencia del pseudotallo a 1 m de altura, la altura de la planta y la cantidad de hojas funcionales. La altura de la planta es la distancia entre la base del pseudotallo hasta la axila de la hoja más joven. En la cosecha, registre el peso del racimo.

Paso 1. Recolectar todas las raíces de una excavación estándar de 20 x 20 x 20 cm la cual se extiende desde el cormo de la planta (Figura 7). Tomar sólo las raíces de la planta seleccionada; no incluir raíces de plantas adyacentes. En el caso de una planta joven, a menudo es más fácil remover el retoño completo de la mata (Figura 7).

Paso 2. Dividir las raíces recolectadas en dos categorías:

- raíces muertas (RM),
- y raíces funcionales (OK)

y contar la cantidad de raíces en cada categoría.

Paso 3. Seleccionar al azar cinco raíces primarias funcionales, por lo menos de 10 cm de largo. El largo de las raíces puede variar; los segmentos muy cortos, que podrían haber sido cortados durante la excavación, pueden ser descartados.

Primero, observe la condición sanitaria general de las raíces secundarias y terciarias. A estas raíces se les refiere como raíces alimentadoras. Luego, reduzca el largo de las cinco raíces funcionales seleccionadas a 10 cm y corte las raíces a lo largo en rebanadas (Figura 8).

Nematodos endoparásitos migratorios: Marque la mitad de cada una de las cinco raíces respecto al porcentaje de corteza radical con necrosis. El máximo de necrosis radical para la mitad de las raíces puede ser de 20%, y por ende la necrosis radical máxima sería de 100% para las cinco mitades de raíces juntas. Registre la necrosis

de las raíces individuales (RN1 a RN5). La suma es la necrosis radical total de la muestra (RN total).

Nematodos noduladores de las raíces: La presencia de nematodos noduladores de las raíces (RK) puede ser observada externamente en las agallas (Figura 9) o internamente como estructuras en forma de cavidades (Figura 10) en las raíces.

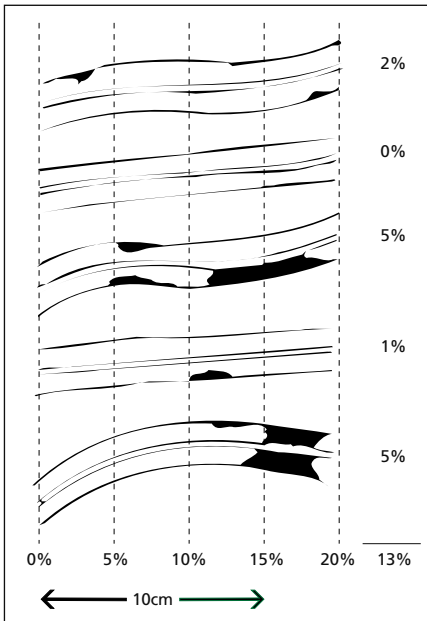


Figura 8. Ejemplo de marcación de cinco raíces de banano cortadas a lo largo para el análisis de la necrosis radical (% de la superficie de la corteza radical con necrosis), causada por los endoparásitos migratorios.



Figura 9. Agallas en las raíces del banano causadas por los nematodos noduladores de las raíces.



Figura 10. Raíces de banano infectadas con las hembras hinchadas de los nematodos noduladores de las raíces.

Fotografías cortesía del Dr. D. De Waele, KULeuven.

Formulario de campo 7. Información ambiental que se recolectará en cada sitio desde la siembra hasta la cosecha
(Debe ser enviado en formato Excel. Si es necesario, INIBAP puede proporcionar formularios electrónicos.)

Sitio:

Encargado:

Latitud: Longitud: Altitud:

Información a recolectar	Semana				
	1	2	3	4	5
Precipitación (mm)					
Temperatura máxima (°C)					
Temperatura mínima (°C)					
Temperatura promedio (°C)					
Humedad relativa máxima (%)					
Humedad relativa mínima (%)					
Humedad relativa promedio (%)					
Número de días sin lluvia					
Número de horas durante las cuales la humedad relativa alcanzó > 90% o más					

Nota: Si el diseño experimental es DBCA, la tabla debe presentarse por bloque.

Bibliografía

- Brun J. 1963. La cercosporiose du bananier en Guinée. Etude de la phase ascosporee de *Mycosphaerella musicola* Leach. Thèse de doctorat ès science. Orsay, Paris, France.
- Carlier J. Comm. Pers. CIRAD, TA 40/02, avenue d'Agropolis, 34398, Montpellier.
- Carlier J., M. F. Zapater, F. Lapeyre, D. R. Jones & X. Mourichon. 2000. Septoria leaf spot of banana; a newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (anamorph *Septoria eumusae*). *Phytopathology* 90:884-890.
- Crous P. W. & X. Mourichon. 2002. *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. Nov.: causal agent of eumusae leaf spot disease. *Sydovia* 54:35-43.
- De Maeseneer J. & C.J. D'Herde. 1963. Méthodes utilisées pour l'étude des anguillules libres du sol. *Revue Agriculture, Bruxelles* 16:441-447.
- De Waele D. 1996. Plant resistance to nematodes in other crops: relevant research that may be applicable to *Musa*. Pp. 108-115 in *New Frontiers in Resistance Breeding for Nematodes, Fusarium and Sigatoka* (E.A. Frison, J-P. Horry & D. De Waele, eds). INIBAP, Montpellier, France.
- De Waele D. & A. Elsen. 2002. Migratory endoparasites: *Pratylenchus* and *Radopholus* species. Pp. 175-206 in *Plant resistance to parasitic nematodes* (J.L. Starr, R. Cook & J. Bridge, eds). CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Eisenback J.D., H. Hirschmann, J.N. Sasser & A.C. Triantaphyllou. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) with a pictorial key. North Carolina State University, Raleigh, USA. 48pp.
- Esbenshade P.R. & A.C. Triantaphyllou. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 17:6-20.
- Fouré E. 1982. Les cercosporioses du bananier et leurs traitements: Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon. *Fruits* 37: 749-771.
- Gowen S. & P. Quénéhervé. 1990. Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. Pp. 431-460 in *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds). CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Hartman K.M. & J.N. Sasser. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. Pp 69-77 in *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. II. Methodology (K.R. Barker, C.C. Carter & J.N. Sasser, eds). North Carolina State University, Raleigh, USA.
- INIBAP-IPGRI/CIRAD. 1996. Descriptores para el banano (*Musa* spp.). 55pp.
- Jones D.R. 2000. Diseases of Banana, Abacá and Enset. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Kinloch R.A. 1990. Screening for resistance to root-knot nematodes. Pp. 16-23 in *Methods for Evaluating Plant Species for Resistance to Plant-Parasitic Nematodes* (J.L. Starr, ed.). The Society of Nematologists, Hyattsville, USA.
- Machon J.E. & D.J. Hunt. 1985. *Pratylenchus goodeyi*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes, Set 8, No. 120. 2 p. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Meredith D.S. 1970. Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola*. *Phytopath.* Paper No. 11.1-147. Commonw. Mycol. Inst.

- Ortiz R., D. Vuylsteke, R.S.B. Ferris, J.U. Okoro, A. N' Guessan, O. B. Hemeng, D.K. Yeboah, K. Afreh-Nuamah, E.K.S. Ahiekpor, E. Fouré, B.A. Adelaja, M. Ayodele, O.B. Arene, F.E.O. Ikiediugwu, A.N. Agbor, A.N. Nwogu, E.Okoro, G. Kayode, I.K. Ipinmoye, S. Akele & A. Lawrence. 1997. Developing new plantain cultivars for Africa. *Plant Varieties and Seeds* 10: 39-57.
- Orton Williams K.J. & M.R. Siddiqi. 1973. *Radopholus similis*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes 2(27):4. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Pinochet J. 1996. Review of past research on *Musa* germplasm and nematode interactions. Pp. 32-44 in *New Frontiers in Resistance Breeding for Nematodes, Fusarium and Sigatoka* (E.A. Frison, J-P. Horry & D. De Waele, eds). INIBAP, Montpellier, France.
- Sasser J.N. & Freckman D.W. 1987. A world perspective on nematology: the role of the Society. Pp. 7-14 in *Vistas on Nematology* (J.A. Veech & D.W. Dickson, eds). Society of Nematologists, Inc, Hyattsville, USA.
- Seinhorst J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4:67-69.
- Seinhorst J.W. 1966. Killing nematodes for taxonomic study with hot F.A. 4:1. *Nematologica* 12: 178.
- Siddiqi M.R. 1972. *Pratylenchus coffeae*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes, 1(6):3. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Siddiqi M.R. 1973. *Helicotylenchus multicinctus*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes 2(23):3. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Speijer P.R. & C.S. Gold. 1996. *Musa* root health assessment: a technique for the evaluation of *Musa* germplasm for nematode resistance. Pp. 62-78 in *New Frontiers in Resistance Breeding for Nematodes, Fusarium and Sigatoka* (E.A. Frison, J-P. Horry & D. De Waele, eds). INIBAP, Montpellier, France.
- Vakili N.G. 1968. Response of *Musa acuminata* species and edible cultivars to infection by *Mycosphaerella musicola*. *Trop. Agr. (Trinidad)* 45:13-22.
- Vuylsteke D. 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Practical manuals for handling crop germplasm *in vitro* 2. International Board of Plant Genetic Resources, Rome. 56pp.
- Wardlaw C. W. 1972. *Banana Diseases*. Longman, London, UK.
-

