

Biotecnología

CULTIVO *in vitro* DE ÁPICES: ¿UNA TÉCNICA SEGURA PARA OBTENER PLANTAS DE BANANO LIBRES DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*?

Marylin Sánchez¹, Claudiana Carr¹, Fabiola Alfaro¹, Silvia Masís², Ana María Conejo³,
Mauricio Guzmán¹, Jorge A. Sandoval²

1/ Laboratorio de Fitopatología. 2/ Laboratorio de Biotecnología. 3/ Laboratorio de Biología Molecular.
Centro de Investigaciones, CORBANA S.A., Apdo. 32-7210, Pococí, Costa Rica.

ABSTRACT

***In vitro* shoot tip culture: a safe technique for obtaining banana plants free of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*?**

The investigation was carried out in the 'Gros Michel' (*Musa* AAA, cv. Cocos), with the objective of determining the possible risk that the *in vitro* multiplication technique has in the transmission of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc). The study covered five stages: in the first stage, the growth of Foc was evaluated in four different culture media: Murashige and Skoog (MS), MS + methylisothiazolinone (MIT) + methylchloroisothiazolinone (CIT), Komada K2 and PDA. In the second stage, the detection of Foc was carried out in vegetative apices of 3 mm, 5 mm and 10 mm in length, from plants affected by Foc. In the third stage, the molecular detection of Foc was carried out in flower tips of plants with symptoms of *Fusarium* wilt. In the fourth stage, vegetative tips ≤ 5 mm in length were obtained from young banana sprouts (sword suckers) with different condition due to *Fusarium* wilt. They were inoculated in K2 culture medium and the presence or absence of Foc was determined by molecular methods. In the fifth stage, the micropropagation of vegetative tips from healthy and affected banana plants by Foc was carried out. Molecular analyzes of axillary shoot, complete *in vitro* plant and vegetative apex were performed to determine the presence or absence of Foc. Under the conditions of this study, Foc was determined to be able to grow in MS and the other culture media evaluated under both continuous light and darkness. The presence of Foc was not detected in floral apices or in vegetative apices of size ≤ 5 mm, nor was it detected in explants due to *in vitro* micropropagation of diseased plants by Foc. The presence of Foc was detected in up to 30 % of explants 10 mm long, from diseased plants; however, mycelial growth was observed in the MS and MS + MIT + CIT culture media, which constitutes an early warning of the presence of the pathogen. Regarding the fifth stage with explants from different stages of the micropropagation process, Foc was not detected in any of the types of explants evaluated either. The molecular analysis only evidenced the presence of *Fusarium* spp. in explants from healthy and affected plants by Foc. This study generates relevant and valuable information that certifies the potential of *in vitro* micropropagation culture as a safe technique to obtain Foc-free *Musa* plants.

Key words: biosecurity, flower tips, *Fusarium* wilt, micropropagation, shoot tips.

RESUMEN

La investigación se llevó a cabo con el objetivo de determinar el posible riesgo que conlleva la técnica de multiplicación *in vitro* en la transmisión del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (Foc) en 'Gros Michel' (*Musa* AAA, cv. Cocos). El estudio abarcó cinco etapas: en la primera etapa se evaluó el crecimiento de Foc en cuatro diferentes medios de cultivo: Murashige y Skoog (MS), MS + metilisotiazolinona (MIT) + metilcloroisotiazolinona (CIT), K2 de Komada y PDA. En la segunda etapa se realizó la detección de Foc en ápices vegetativos de 3 mm, 5 mm y 10 mm de longitud, provenientes de plantas enfermas por Foc. En la tercera etapa, se realizó la detección molecular de Foc en ápices florales de plantas con síntomas del marchitamiento por *Fusarium*. En la cuarta etapa, se obtuvieron ápices vegetativos ≤ 5 mm de longitud, provenientes de brotes jóvenes de banano (hijos espada) con diferente condición por el marchitamiento por *Fusarium*. Se sembraron en medio de cultivo K2 y por métodos moleculares se determinó la presencia o ausencia de Foc. En la quinta etapa se realizó la micropropagación de ápices vegetativos provenientes de plantas de banano sanas y enfermas por Foc. Se realizaron análisis moleculares de ápice vegetativo, brote axilar y planta completa *in vitro*, para determinar la presencia o ausencia de Foc. Bajo las condiciones de este estudio se determinó que Foc es capaz de crecer en Murashige y Skoog (MS) y en los otros medios de cultivo evaluados, tanto bajo luz continua como en la oscuridad. No se detectó la presencia de Foc en ápices florales ni en ápices vegetativos de tamaño ≤ 5 mm, tampoco fue detectado en explantes producto de la micropropagación *in vitro* de plantas enfermas por Foc. Se detectó la presencia de Foc hasta en un 30 % de los explantes de 10 mm de longitud, provenientes de plantas enfermas; sin embargo, se observó el crecimiento de micelio en los medios de cultivo MS y MS + MIT + CIT, lo que constituye una alerta temprana de la presencia del patógeno. En cuanto a la quinta etapa con explantes provenientes de distintas fases del proceso de micropropagación, tampoco fue detectado Foc en ningunos de los tipos de explantes evaluados. El análisis molecular solo evidenció la presencia de *Fusarium* spp. en los explantes provenientes de plantas sanas y enfermas por Foc. Este estudio genera información relevante y valiosa que certifica el potencial del cultivo *in vitro* de ápices como técnica segura para obtener plantas de *Musa* libres de Foc.

Palabras clave: ápices florales, ápices vegetativos, bioseguridad, marchitamiento por *Fusarium*, micropropagación.

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos se encuentran entre los principales productos agrícolas en los trópicos y forman parte de la alimentación básica de la población en muchos países alrededor del mundo. Sin embargo, su producción, productividad y calidad se ven afectadas por el ataque de plagas y enfermedades. Entre las principales enfermedades que los afectan se encuentra el marchitamiento por *Fusarium*, causado por el hongo de suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (Foc) (Stover y Simmonds 1987, Ploetz 2005, Ploetz 2015a, Ploetz 2015b, Dita *et al.* 2018). En Costa Rica, desde inicios de la década de los años cincuenta (Stover 1972, Ploetz 2005, Ploetz 2018), se determinó la presencia de la raza 1 de Foc afectando bananos del tipo 'Gros Michel' (AAA) y 'Manzano' (AAB). El patógeno ingresa por la raíz e invade sistémicamente toda la planta hasta provocar su muerte. Se ha confirmado la presencia de

Foc en raíces, cormo, haces vasculares del pseudotallo, pseudopeciolo y lámina foliar de plantas de banano (Warman y Aitken 2018); sin embargo, hasta el momento no se ha confirmado la presencia de este patógeno en ápices meristemáticos vegetativos ni florales.

El marchitamiento por *Fusarium* es una enfermedad de rápida diseminación por medio de material vegetal contaminado (Stover 1972, Stover y Simmonds 1987, Ploetz y Pegg 2000), por lo que se recomienda el uso de semilla limpia al establecer nuevas plantaciones (Pegg *et al.* 1996). Para esto, se deben aplicar técnicas seguras como la propagación de plantas por medio de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales que disminuyan el riesgo de entrada de Foc a un territorio. El científico austriaco Gottlieb Haberland, es considerado el pionero y padre de las técnicas y metodologías iniciales de cultivo de tejidos vegetales, cultivo *in vitro* de plantas y/o micropropagación; sus estudios fueron publicados en 1902, de acuerdo con

lo indicado por Krikorian y Berquan (1969). Cincuenta y ocho años después, apareció la primera comunicación científica relacionada con el cultivo *in vitro* de órganos y tejidos en el género *Musa* (Cox *et al.* 1960), en donde publicaron la metodología de rescate y cultivo *in vitro* de embriones de *Musa balbisiana* Colla (AA). Con el transcurso del tiempo y hasta la fecha, muchas aplicaciones del cultivo *in vitro* de plantas han sido tema de investigación, de publicación y de uso alrededor del mundo.

La aplicación de la biotecnología vegetal en el género *Musa*, ha abarcado temas tales como: micropropagación a partir de ápices vegetativos, obtención de material libre de virus, embriogénesis somática, transformación genética, conservación *in vitro*, crioconservación, inducción de mutaciones *in vitro*, cultivo de ápices florales y más recientemente edición genética (Sandoval y Moncaleán 2020). A partir del primer trabajo publicado sobre micropropagación en banano (Ma y Shii 1972) se han puesto en manifiesto las grandes ventajas de disponer de plantas obtenidas en los laboratorios, en condiciones asépticas. Las ventajas han sido demostradas en la práctica con la obtención de plantas más vigorosas, más productivas y libres de enfermedades, condición que ha sido utilizada para la conservación de germoplasma valioso y para el intercambio seguro de materiales dentro de un país y entre países (INIBAP 2006).

El intercambio internacional de germoplasma es una de las aplicaciones más utilizadas del cultivo *in vitro* de plantas en cientos de especies a nivel mundial. Para el caso concreto de los bananos y plátanos, el uso del cultivo *in vitro* para el manejo seguro de germoplasma no es nuevo (Vuylsteke 1989, Garming *et al.* 2010). El primer boletín donde se hacía un llamado a usar dicha técnica para el manejo seguro, intercambio e introducción de germoplasma de musáceas

a nivel internacional fue publicado a finales de los 90's (Diekmann y Putter 1996). Más recientemente (Thomas 2015) editó y publicó información al respecto e indicó que la técnica es usada en centros de investigación en musáceas con fines de manejo adecuado de los recursos fitogenéticos.

Asimismo, con la llegada de Foc Raza 4 Tropical (Foc R4T) al continente americano, concretamente a Colombia en agosto de 2019 (García-Bastidas *et al.* 2020), es necesario evaluar posibles fuentes de genotipos tolerantes y/o resistentes a la enfermedad. Por esto una pregunta indispensable a contestar sería: ¿es el cultivo *in vitro* de ápices de *Musa* una técnica segura para obtener material libre de Foc en las descendencias?

Existen pocas publicaciones científicas sobre el tema. En el 2017 nuestro equipo de investigación inició y obtuvo resultados preliminares (Sandoval *et al.* 2017). Por tal razón, se llevó a cabo la presente investigación con el objetivo de determinar si el cultivo *in vitro* de ápices vegetativos y florales, provenientes de plantas de banano con síntomas del marchitamiento por *Fusarium* (Foc), es una técnica segura y adecuada para la obtención de plantas sanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de la investigación

La investigación se realizó en el Centro de Investigaciones de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA, S.A.), ubicado en el cantón de Pococí, provincia de Limón, Costa Rica, así como dos plantaciones experimentales del subgrupo 'Gros Michel' (*Musa* AAA cv. Cocos) ubicadas en el Cantón de Pococí afectadas por Foc raza 1.

El estudio comprendió cinco experimentos para evaluar el riesgo de transmisión de Foc al usar la técnica de

micropropagación *in vitro*. A continuación se detalla la metodología utilizada para cada uno de estos.

Etapa I. Prueba de crecimiento de Foc en medios de cultivo

Preparación de medios de cultivo

Se prepararon cuatro diferentes medios de cultivo; dos son de uso frecuente en laboratorios de Fitopatología: papa dextrosa agar (PDA) a 39 g L⁻¹, de uso general en crecimiento de patógenos y Komada modificado K2, selectivo para *Fusarium oxysporum* (Sun *et al.* 1978). Los otros dos, de uso común en los laboratorios de biotecnología vegetal, consistieron en dos variantes de MS (Murashige y Skoog 1962) con y sin supresor microbiológico a 2 ml L⁻¹ (MIT+CIT= metilisotiazolinona + metilcloroisotiazolinona), suplementado en ambos casos con los siguientes componentes: 0,1 mg L⁻¹ de tiamina, 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina, 2 mg L⁻¹ de glicina, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2 g L⁻¹ de phytigel, a un pH ajustado de 5,8.

Inoculación en medio de cultivo *in vitro*

Tres aislamientos reactivados de Foc raza 1 de patogenicidad comprobada, provenientes de la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología de CORBANA, S.A., fueron incubados por 5 días a 27 °C en condiciones de oscuridad. Posteriormente, con la ayuda de un sacabocados, un disco de micelio de cada aislamiento de Foc se colocó en el centro de un plato de Petri con el medio de cultivo a evaluar. Dichos cultivos fueron incubados por espacio de 6 días a 27 °C en condiciones de luz continua (3.335 LUX)

mientras que el otro tratamiento fue incubado en condiciones de oscuridad continua para luego medir con la ayuda de un vernier, el diámetro de la colonia de Foc en la placa de Petri.

Etapa II. Detección de Foc en ápices vegetativos: evaluación de tres diferentes tamaños de explante

Muestreo en campo

El material para la fase experimental se colectó de una plantación de 'Gros Michel' (*Musa AAA*, cv. Cocos) con síntomas avanzados del marchitamiento por *Fusarium* raza 1, cercanos a grado 15 de la escala de evaluación propuesta por Sánchez *et al.* (2019). Se muestrearon 30 hijos (1,0-1,3 m de altura) de plantas madres con síntomas a las cuales le fueron eliminadas las raíces suelo y capas externas de las vainas foliares que presentaban algún daño o deterioro hasta dejar el cormo con un segmento de pseudotallo. Los cormos se trasladaron a un invernadero y se redujeron hasta 100 mm de longitud. Luego fueron asperjados con una mezcla de bactericida más fungicida (Agri-mycin® 16,5 WP: terramicina + estreptomycin y Benlate® 50 WP: benomil; ambos productos a una dosis de 2,5 g L⁻¹) y con un reposo por 24 horas. Posteriormente, el material fue reducido hasta una dimensión de 40 mm. El material resultante fue trasladado al laboratorio de Biotecnología para continuar el proceso experimental.

Diseción del ápice vegetativo

El material una vez lavado con jabón líquido, se enjuagó con abundante agua y fue sumergido en NaOCl al 4 % durante 30 minutos. La reducción del tamaño del explante continuó hasta 20 mm luego del

cual volvieron a sumergirse en una solución estéril de NaOCl al 4 % + Tween 20® por 15 min. A continuación y dentro de una cámara de flujo laminar se procedió a realizar tres enjuagues al material con agua destilada estéril y los ápices resultantes fueron disectados para la obtención de explantes finales (ápices vegetativos) con tres diferentes tamaños (3 mm, 5 mm y 10 mm de longitud aproximadamente), los que fueron colocados en una solución estéril de ácido ascórbico (0,1 g L⁻¹) por 20 minutos.

Inoculación en medio de cultivo *in vitro*

Cada ápice se dividió en 4 partes iguales longitudinales que fueron inoculadas en cada uno de los medios de cultivo evaluados en la etapa I (MS, MS + MIT + CIT, K2 y PDA) e incubadas por 8 días a 27 °C en condiciones de luz continua (3.350 LUX).

Análisis molecular

Al finalizar la incubación se enviaron las placas de Petri con los segmentos de ápices al laboratorio de Biología Molecular de CORBANA, S.A., esto para identificar si existía o no la presencia del patógeno. Para la detección de *Fusarium* fueron utilizados los siguientes marcadores moleculares: ITSfuf/r (Wei *et al.* 2012) para *Fusarium* spp., FOF1/R1 (Jiménez *et al.* 2010), FnSc1/2 (Lin *et al.* 2010), CLOX1/2 (Mule *et al.* 2004) para *Fusarium oxysporum* y FOC1/2 (Lin *et al.* 2009) para *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense*.

Etapla III. Detección de Foc en ápices florales provenientes de plantas con síntomas del marchitamiento por *Fusarium*

Muestreo en campo

De una plantación de banano del subgrupo 'Gros Michel' (*Musa* AAA cv. Cocos)

altamente infectada por Foc raza 1 se tomaron 40 inflorescencias masculinas (chiras): 20 chiras de plantas con síntomas y 20 chiras de plantas asintomáticas. Además, muestras de pseudotallo con haces vasculares decolorados fueron colectadas para realizar la confirmación de la presencia del patógeno.

Disección del ápice floral

En el laboratorio de Biotecnología Vegetal de CORBANA, S.A., las chiras se disectaron gradualmente para eliminar poco a poco cada bráctea floral hasta obtener un tamaño de 50 mm aproximadamente. Dichas secciones se lavaron con jabón líquido y enjuagaron con agua destilada estéril para sumergirse en una solución de NaOCl al 4 % durante 30 minutos. Posteriormente, una segunda reducción del tamaño del explante tuvo lugar hasta una dimensión de 20 mm, sumergiéndose nuevamente en una solución de NaOCl al 4 % + Tween® 20 por 15 min y tres enjuagues del material con agua destilada estéril en una cámara de flujo laminar. Los ápices se redujeron nuevamente hasta obtener un tamaño de 6 mm aproximadamente. Estos ápices fueron divididos en dos partes iguales mediante un corte longitudinal, una parte para inoculación *in vitro* y otra para análisis molecular.

Inoculación en medio de cultivo *in vitro*

En el laboratorio de Fitopatología se procedió con la colocación de la primera de las partes del ápice floral y segmentos de haces vasculares en un medio de cultivo semi selectivo Komada modificado (K2), el cual mejora la expresión de las características morfológicas de Foc, facilitando su identificación. Las placas fueron incubadas a 27 °C, bajo luz continua (3.335 LUX) por 8 días.

Análisis molecular

La otra parte del ápice, se envió al laboratorio de Biología Molecular de CORBANA, S.A., en donde se realizó la extracción de ADN del tejido (Brandfass y Karlovsky 2008) de haces vasculares y ápices florales, para identificar la presencia de *Fusarium*, mediante la técnica de PCR convencional y el uso de los siguientes marcadores específicos: ITS-Fu-f/ITS-Fu-r (Wei *et al.* 2012), PFO2/PFO3 (Edel *et al.* 2000) para *F. oxysporum* y FOC1/ FOC2 (Lin *et al.* 2009) para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Etapa IV. Posible detección de Foc en ápices vegetativos: plantas jóvenes con diferente condición por el marchitamiento por *Fusarium*

Muestreo en campo

En el campo fueron seleccionadas 40 unidades productivas de plantas jóvenes de banano 'Gros Michel' con tres diferentes condiciones respecto al marchitamiento por *Fusarium*: a. madre e hijo con síntomas (20 plantas), b. madre con síntomas e hijo sin síntomas (10 plantas) y c. madre e hijo sin síntomas (10 plantas). Hijos espada fueron seleccionados en cada unidad de producción y separados de la planta madre con un palín. Para disectar el ápice vegetativo, se utilizó el mismo procedimiento descrito en la etapa III hasta un tamaño de 30 mm.

Inoculación en medio de cultivo *in vitro*

Una vez listo el explante, fue dividido longitudinalmente en dos segmentos iguales e inoculado por duplicado en medio de cultivo K2 de Komada, donde fueron incubados por 8 días a 27 °C en condiciones de luz continua (3.335 lux).

Análisis molecular

Los cultivos obtenidos con presencia de micelo se analizaron molecularmente mediante la técnica de PCR convencional para corroborar la presencia o ausencia del patógeno. Para esto fueron utilizados los marcadores moleculares: ITSFuf/r (Wei *et al.* 2012) para el caso de *Fusarium* spp., FOF1/R1 (Jiménez *et al.* 2010), FnSc1/2 (Lin *et al.* 2010), CIOX1/2 (Mule *et al.* 2004) para *Fusarium oxysporum* y FOC1/2 (Lin *et al.* 2009) para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Etapa V. Micropropagación hasta fase de vivero

Muestreo en campo

En el campo se tomaron cormos de 15 plantas jóvenes de banano del subgrupo 'Gros Michel' (*Musa* AAA cv. Cocos) con síntomas del marchitamiento por *Fusarium* y 15 cormos de plantas asintomáticas, además de muestras de pseudotallo de las mismas plantas anteriormente muestreadas y de plantas adultas (madres).

Inoculación en medio de cultivo *in vitro*

En el laboratorio de Fitopatología de CORBANA S.A., se seleccionaron segmentos de tejido vegetal con haces vasculares obstruidos (coloración café-rojiza). En los casos en que las muestras no presentaban síntomas se seleccionaron los haces vasculares al azar. El material fue desinfectado mediante un lavado en agua estéril con cloro al 0,04 %, seguido de dos lavados con agua desionizada estéril y los segmentos secados en toallas de papel estéril. Los extremos de los segmentos seleccionados se redujeron a 50 mm y fueron inoculados directamente en el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA: 39 g/L) más antibiótico (AgriMycin 16,5 WP al 0,5 %) incubándose a 26 °C, en condiciones de oscuridad durante 7 días.

Micropropagación *in vitro*

La disección del ápice vegetativo de cada planta siguió el mismo procedimiento descrito en la etapa II de esta investigación y solamente difirió en el tamaño final del ápice que fue de 8- 10 mm aproximadamente. Dichos explantes pasaron a la fase 1 de establecimiento (E-1), la cual consistió en sembrar el ápice en el medio de cultivo de iniciación (MS) suplementado y con 1 mg L⁻¹ de BAP. Posteriormente, se incubaron en condiciones controladas con un fotoperiodo de 16 horas por 30 días, una intensidad lumínica de 4.440 lux y una temperatura de 27 °C. Transcurrido este tiempo, en la fase de establecimiento E-2 se procedió a realizar un corte longitudinal al explante para eliminar la dominancia apical y estimular la producción de brotes. Cada parte fue colocada en el medio de multiplicación (MS) suplementado y con 3 mg L⁻¹ de BAP. Al inicio de la fase M-2, 100 frascos con material vegetal (23 provenientes de plantas enfermas y 73 de plantas sanas), fueron incubados durante 30 días en un cuarto de ambiente controlado con un fotoperiodo de 16 horas, una intensidad lumínica de 4.440 lux y 27 °C. El mismo procedimiento de multiplicación fue repetido 10 veces. Luego, los explantes pasaron a la fase 3 o enraizamiento, en la cual las plántulas desarrolladas previamente se sembraron en un medio de cultivo MS sin BAP, dichos cultivos fueron establecidos en un cuarto de ambiente controlado por 30 días, siguiendo un fotoperiodo de 16 horas, una intensidad lumínica de 4.440 lux y 27 °C.

Fase de vivero

Una vez transcurrido el tiempo para crecimiento y desarrollo de raíz, la siembra se efectuó en bandejas con "peat moss" como sustrato para establecer la fase 4 o de aclimatación. Las plantas fueron sometidas a humedad constante con la aplicación foliar de una solución fertilizante compuesta por 2,5 ml de Bayfolan Forte®, 3 ml de Tecamin

max® y 2,5 g de Urea L⁻¹, dos veces por semana hasta la tercera semana. La fertilización dio inicio cuando las plantas tenían 7 días en bandeja. Al transcurrir 6 semanas, las plantas fueron trasplantadas a bolsas con suelo (F-5), fertilizándose con Osmocote® 5 g planta⁻¹ y una solución compuesta por 3,75 ml de Bayfolan Forte®, 4,5 ml de Tecamin max® y 3,75 g de Urea L⁻¹ una semana después de trasplantadas. Las plantas permanecieron en etapa de vivero e invernadero durante 6 semanas.

Análisis molecular

Este se efectuó a las muestras de tejido de pseudotallo de las plantas muestreadas y del cultivo en placa de Petri de los haces vasculares. De igual manera hubo análisis moleculares al tejido correspondiente a las diferentes etapas de la micropropagación: 179 brotes axilares de la fase de multiplicación (135 de asintomáticas y 44 de sintomáticas), 20 plantas enteras de la fase de enraizamiento (10 de asintomáticas y 10 de sintomáticas) y 23 ápices vegetativos provenientes de las plantas en fase 5 (10 de asintomáticas y 13 de sintomáticas). El método de PCR convencional con los siguientes marcadores moleculares ITSFuf-f/ ITSFuf-r (Wei *et al.* 2012) para *Fusarium* spp., PFO2/3 (Edel *et al.* 2000) y FOC1/2 descritos por Lin *et al.* (2009) para identificar *F. oxysporum* f. sp. *cubense* fueron utilizados.

RESULTADOS

Etapas I. Prueba de crecimiento de Foc en medios de cultivo

Los aislamientos de Foc raza 1 fueron capaces de crecer en los cuatro medios de cultivo evaluados (PDA, K2, MS y MS + supresor microbiológico MIT + CIT), incubados tanto en presencia de luz como en la oscuridad a 27 °C (Figuras 1 y 2). Se puede afirmar que el medio de cultivo MS utilizado en la micropropagación de ápices de *Musa*, permite el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

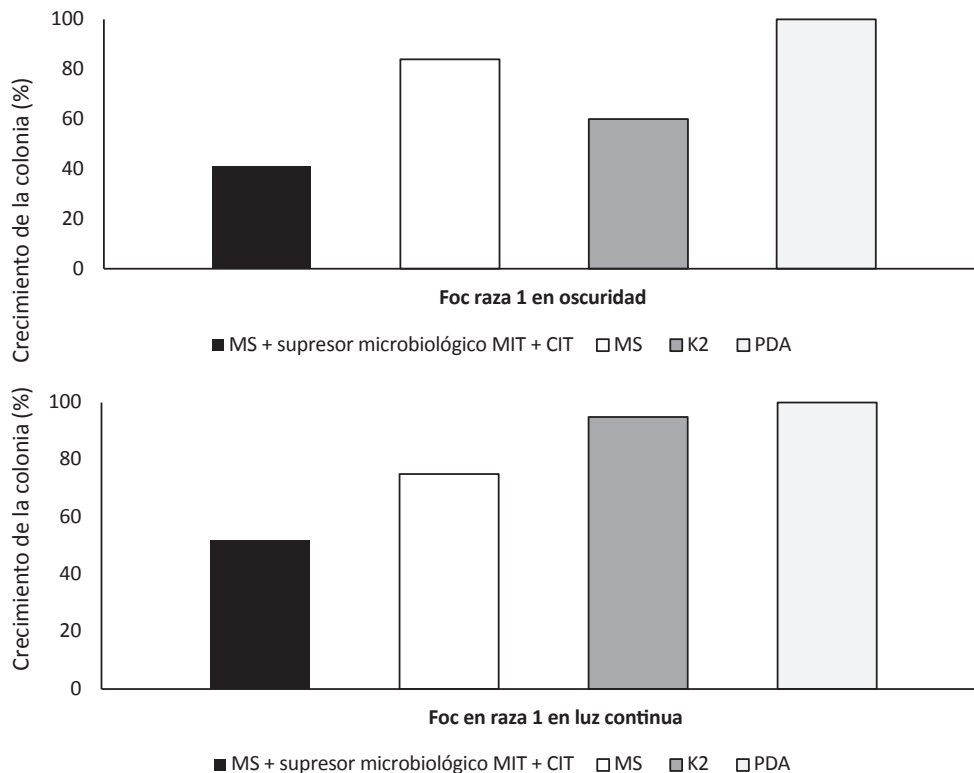


Fig. 1. Etapa I. Evaluación del crecimiento de la colonia de tres aislamientos de Foc raza 1 en diferentes medios de cultivo bajo condiciones de incubación en luz continua y oscuridad a 27 °C. Supresor microbiológico compuesto por MIT+CIT= metilisotiazolinona + metilcloroisotiazolinona. Los valores se expresan en porcentajes respecto al crecimiento obtenido en medio de cultivo PDA de uso general para hongos.

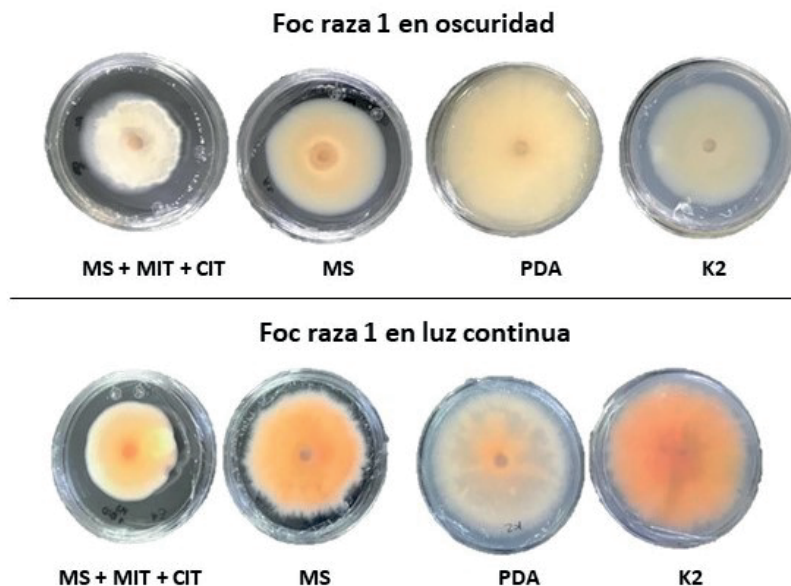


Fig. 2. Etapa I. Características fenotípicas de las colonias de Foc raza 1 en los diferentes medios de cultivo evaluados, en condiciones de oscuridad y luz continua, incubados a 27° C por 6 días.

Etapa II. Detección de Foc en ápices vegetativos: evaluación de tres diferentes tamaños.

De acuerdo con el tamaño del explante hay mayor o menor posibilidad de encontrar la enfermedad en los medios de cultivo (Cuadro 1). En explantes pequeños (3 mm) y medianos (5 mm) no se detectó la presencia de Foc en medio de cultivo K2 ni por técnicas moleculares. En contraste se detectó Foc en el 30 % de los explantes grandes (10 mm de longitud), presentando crecimiento del hongo en todos los medios de cultivo evaluados.

Etapa III. Detección de Foc en ápices florales provenientes de plantas sin síntomas y con síntomas del marchitamiento por Fusarium

Para los ápices provenientes de plantas asintomáticas no se obtuvo crecimiento del hongo en el medio de cultivo K2; no obstante, los análisis moleculares determinaron la presencia de *Fusarium* spp. en un 70 % de las muestras evaluadas (Cuadro 2). Con los iniciadores más específicos para determinar la presencia de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no se logró identificar la presencia del patógeno. Para el caso de los ápices florales provenientes de las plantas sintomáticas tampoco fue posible aislar al patógeno en el medio de cultivo K2. Los análisis moleculares determinaron en un 75 % de las muestras de ápices florales analizados la presencia de *Fusarium* spp.; mientras que no se registró detección de *Fusarium oxysporum* ni de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Al analizar molecularmente la presencia de Foc en las muestras de pseudotallo, se identificó *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en el 60 % de las muestras de tejido provenientes de plantas enfermas y en el 100 % de las muestras se observó crecimiento de micelio en K2, medio selectivo para este patógeno.

Etapa IV. Posible detección de Foc en ápices vegetativos: plantas jóvenes con diferente condición por el marchitamiento por Fusarium.

No se identificó la presencia de Foc en ápices vegetativos obtenidos de hijos de plantas asintomáticas y sintomáticas del marchitamiento (Cuadro 3). Se detectó *Fusarium* spp. en el 80 % de los ápices provenientes de hijos enfermos con madres enfermas y en el 40 % de los ápices provenientes de hijos sin síntomas pero con madres enfermas. En contraste, no se logró identificar ningún tipo de *Fusarium* en los ápices vegetativos de hijos asintomáticos provenientes de plantas asintomáticas.

Etapa V. Micropropagación hasta fase de vivero

En las muestras de plantas madres sintomáticas se detectó *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) en el 90 %; mientras que en los hijos de plantas sintomáticas solamente fue identificado en un 10 % de las muestras; en muestras de plantas asintomáticas no se detectó Foc, solamente *Fusarium oxysporum* en el 10 % de estas (Cuadro 4).

Se detectó *Fusarium* spp. en todos los tipos de explantes (ápice vegetativo, brote axilar y planta completa *in vitro*), independientemente de la condición de síntomas de la plantas. *Fusarium oxysporum* fue encontrado únicamente en el brote axilar y en mayor porcentaje en plantas asintomáticas (11 %). No se detectó la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en ninguno de los explantes utilizados obtenidos de las diferentes etapas (Cuadro 5).

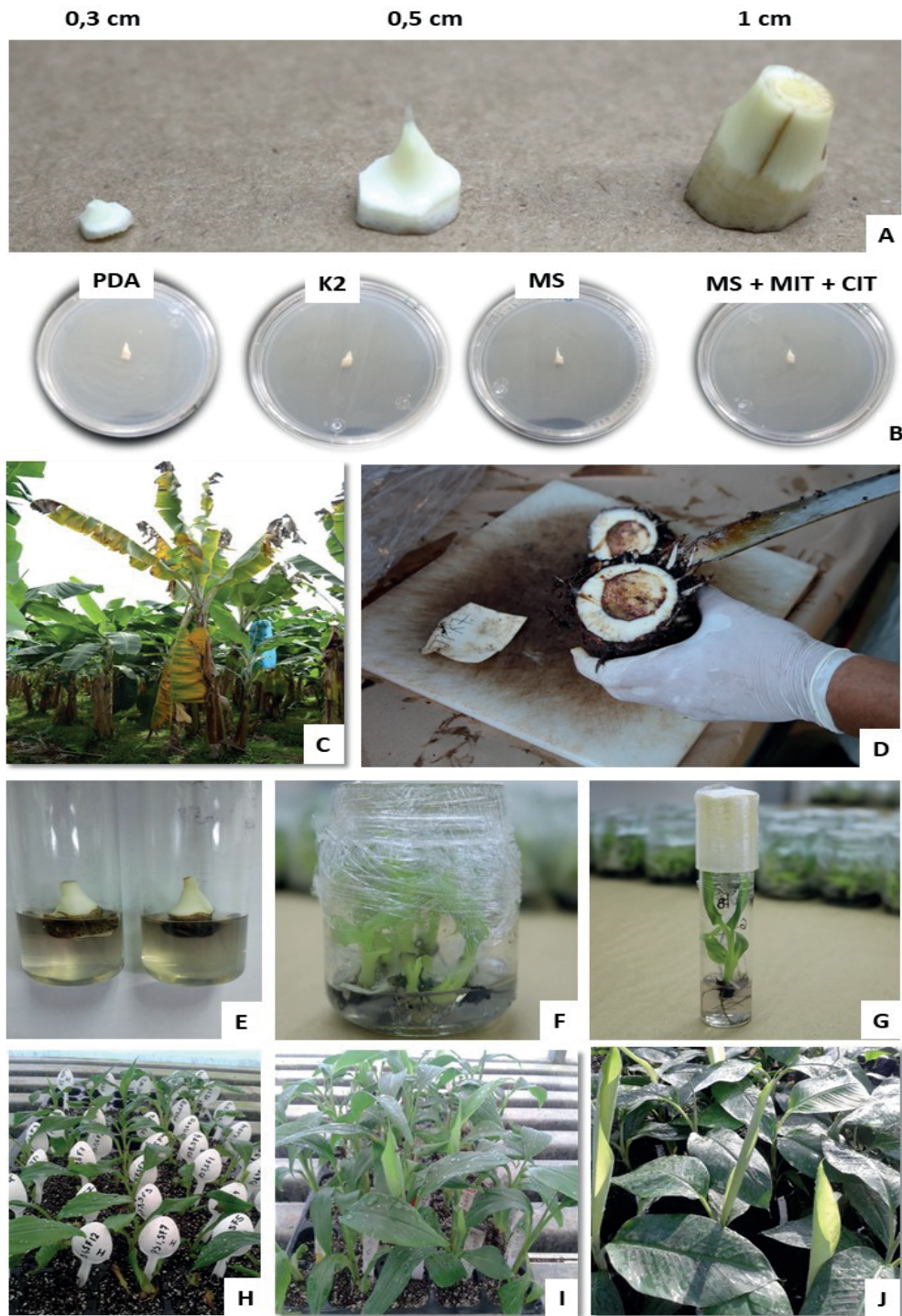


Fig. 3. Evidencia fotográfica durante las diferentes etapas de la investigación. **A.** Tamaños de los ápices evaluados: 3 mm, 5 mm y 10 mm respectivamente. **B.** Siembra de partes iguales del ápice vegetativo en los diferentes medios de cultivo evaluados. **C.** Planta de ‘Gros Michel’ enferma por Foc. **D.** Síntomas internos en cormos de plantas muestreadas para las diferentes pruebas. **E.** Cultivo de ápices vegetativos en etapa V. **F.** Fase de multiplicación en cuarto de incubación. **G.** Planta completa *in vitro*. **H, I, J.** Plantas en fase de aclimatación y vivero.

Cuadro 1. Etapa II. Frecuencia de la identificación molecular de *Fusarium* spp., *Fusarium oxysporum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* en los diferentes tamaños de ápices meristemáticos obtenidos de plantas enfermas.

Tamaño del ápice	Medio de cultivo	Con crecimiento fúngico en el medio (%)	Resultados del BioPCR (% de casos positivos)		
			<i>Fusarium</i> spp. Wei et al. 2012	<i>Fusarium oxysporum</i> Mule et al. 2004, Lin et al. 2010, Jimenez et al. 2010	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> Lin et al. 2009
3 mm	PDA	20	20	0	0
	K2	40	40	0	0
	MS	40	40	0	0
	MS + MIT ¹ + CIT ²	30	30	0	0
5 mm	PDA	30	30	0	0
	K2	40	40	0	0
	MS	20	20	0	0
	MS + MIT+ CIT	10	10	0	0
10 mm	PDA	60	60	30	30
	K2	40	40	20	20
	MS	50	50	20	20
	MS + MIT+ CIT	30	30	10	10

1/ MIT = metilisotiazolinona. 2/ CIT = metilcloroisotiazolinona.

Cuadro 2. Etapa III. Frecuencia de identificación molecular de *Fusarium* spp., *F. oxysporum* y *F. oxysporum* f. sp. *ubense* en ápices florales inoculados en medio K2, provenientes de plantas asintomáticas y sintomáticas del marchitamiento por *Fusarium* y haces vasculares obstruidos de las plantas sintomáticas muestreadas.

Tipo de muestra	Muestras con crecimiento en K2 (%)	Resultados del PCR directo (% de casos positivos)		
		<i>Fusarium</i> spp. Wei et al. 2012	<i>Fusarium oxysporum</i> Edel et al. 2000	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> Lin et al. 2009
Ápice floral planta asintomática	0	70	0	0
Ápice floral planta sintomática	0	75	0	0
Has vascular de planta sintomática	100	100	60	60

Cuadro 3. Etapa IV. Frecuencia de identificación molecular de *Fusarium* spp., *F. oxysporum* y *F. oxysporum* f. sp. *cupense* en ápices meristemáticos de plantas jóvenes provenientes de unidades productivas en diferente condición por el marchitamiento por *Fusarium*.

Condición de la cepa de origen del ápice vegetativo	Con crecimiento fúngico en K2 (%)	Resultados del Bio PCR (% de casos positivos)		
		<i>Fusarium</i> spp. Wei et al. 2012	<i>Fusarium oxysporum</i> Mule et al. 2004, Lin et al. 2010, Jiménez et al 2010	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> Lin et al. 2009
Madre e hijo con síntomas	80	80	0	0
Madre con síntomas, hijo sin síntomas	40	40	0	0
Madre e hijo sin síntomas	0	0	0	0

Cuadro 4. Etapa V. Frecuencia de identificación molecular de *Fusarium* spp., *Fusarium oxysporum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* en muestras de cultivo puro en placa de Petri, resultantes de la siembra en PDA de haces vasculares de planta madre sintomática, hijo sintomático y plantas asintomáticas.

Procedencia del has vascular	Con crecimiento en PDA (%)	Resultados del Bio PCR (% de casos positivos)		
		<i>Fusarium</i> spp. Wei et al. 2012	<i>Fusarium oxysporum</i> Edel et al. 2000	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> Lin et al. 2009
Planta enferma	100	100	100	90
Hijo de planta enferma	30	30	10	10
Asintomática	10	10	10	0

Cuadro 5. Etapa V. Frecuencia de identificación molecular de *Fusarium* spp., *F. oxysporum* y *F. oxysporum* f. sp. *cupense* en los diferentes explantes provenientes de las diferentes fases del proceso de micropropagación *in vitro* de plantas asintomáticas y sintomáticas por el marchitamiento por *Fusarium*.

Fase del proceso	Tipo de explante	Tipo planta (explantes analizados)	Resultados del PCR directo (% de casos positivos)		
			<i>Fusarium</i> spp. Wei et al. 2012	<i>Fusarium oxysporum</i> Lin et al. 2010	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> Lin et al. 2009
Multiplicación	Brote axilar	Asintomática (136 explantes) ¹	13	11	0
		Sintomática (44 explantes)	16	7	0
Crecimiento y desarrollo	Planta entera	Asintomática (10 explantes)	70	0	0
		Sintomática (10 explantes)	10	0	0
Vivero	Ápice vegetativo	Asintomática (10 explantes)	30	0	0
		Sintomática (13 explantes)	8	0	0

¹/Número de explantes, corresponde al 100 % de muestras analizadas por PCR.

DISCUSIÓN

La necesidad de obtener plantas de banano libres de patógenos con una alta tasa de propagación ha obligado a la optimización de las técnicas de multiplicación *in vitro* a partir de ápices meristemáticos (Suman 2017). Esta es una de las técnicas más utilizadas y eficientes para producir plantas libres de patógenos como hongos, bacterias (Ngomuo *et al.* 2014, Kithaku 2019), y virus como el del estriado del banano, mosaico del pepino y el bunchy top (BBTV) (Magee, 1940; Berg and Bustamante 1974; Sathiamoorthy *et al.* 2001; Lassois *et al.* 2013; Tchatchambe *et al.* 2020), los cuales pueden llegar hasta los tejidos cercanos a los ápices meristemáticos de las plantas (Thomas y Soly 2009, Tchatchambe *et al.* 2020).

Además de limpiar virus y bacterias con altos porcentajes de éxito, la técnica ofrece la posibilidad de producir plantas libres de patógenos como hongos. En estudios realizados por Swamy y Sahijram (1989) en micropropagación de plantas de banano, se demostró que la técnica fue capaz de proveer brotes libres de Foc a partir de ápices florales masculinos con el cultivar Rasthali (sin. 'Silk' AAB) a pesar que estos provenían de una plantación severamente afectada por Foc raza 2.

Uno de los principales hallazgos obtenidos en esta investigación, fue la evidencia del crecimiento del micelio de Foc en los diferentes medios de cultivo utilizados en la micropropagación. Lo anterior concuerda con lo obtenido por Hamill (2018), quien inoculó ápices vegetativos *in vitro* con Foc raza 1 y se observó crecimiento de micelio en el medio de cultivo MS e inclusive hubo presencia de plántulas en desarrollo con síntomas de Foc. Esto implica que si el explante está contaminado por Foc, hay una alta posibilidad de identificarlo en las etapas iniciales de la multiplicación *in vitro*.

En las evaluaciones de ápices florales y vegetativos, se identificaron mediante técnicas de PCR especies de *Fusarium* spp. en el tejido en estudio. Es conocida la presencia de endófitos en plantas de banano (Zapata 2019). Garret citado por Kumari y Kumar (2015), mencionó que algunas especies de *Fusarium* pueden colonizar el tejido y convertirse a su estado endófito. Estos autores también señalaron que se han realizado aislamientos de especies de *Fusarium* no patogénicas obtenidas de cultivos de ápices vegetativos. Alabouvette *et al.* (1993) y Larkin *et al.* (1996) confirmaron que aislamientos endófitos de *Fusarium* pueden ayudar a desarrollar la resistencia ante la enfermedad y comprobaron que en plantas ubicadas en lugares con baja incidencia de Foc, se encontraban especies de *Fusarium* no patogénicas en los ápices vegetativos. Forsyth *et al.* (2006) realizaron un estudio en condiciones de invernadero con inoculaciones controladas de Foc raza 1 y raza 4 tropical. Dichos autores encontraron la presencia de una especie endófito de *Fusarium* spp. que fue capaz de provocar una decoloración media de tejidos internos en las plantas, a diferencia de una decoloración severa manifestada por otras plantas sin presencia del endófito; por ello indicaron que especies endofíticas de *Fusarium* pueden ser capaces de incrementar o disminuir los síntomas del marchitamiento por *Fusarium*.

No fue posible observar el crecimiento de micelio en los ápices florales cultivados en K2, solamente en ápices vegetativos de 10 mm de tamaño. En la evaluación de los diferentes tamaños del explante se determinó que dicha característica juega un papel crucial en la presencia de contaminación y transmisión de Foc. Por tanto, se determinó que los explantes más grandes (10 mm) tienen mayor riesgo de llevar el patógeno en el tejido durante las fases de cultivo *in vitro*. Estos resultados concuerdan con Kithaku (2019), quien indicó

que explantes grandes pueden presentar problemas de desinfección, debido a la presencia de bacterias y hongos. Por otro lado, Van den Houwe y Panis (2004) también indican que el tamaño óptimo del explante depende del propósito del mismo. Según estos autores, cuando se requiere la eliminación de virus o bacterias, el cultivo de tejidos es una excelente opción, pero el explante deberá reducirse a un tamaño entre 0,5-1 mm, dejando el domo meristemático con una o dos hojas iniciales, lo que a su vez plantea la desventaja de la posible alta mortalidad y un crecimiento inicial más lento. En esta misma línea, diferentes investigadores han demostrado que la tasa de obtención de una planta de banano a partir de cultivo *in vitro* de meristemas libre de virus está inversamente relacionada al tamaño del meristemo aislado (Faccioli y Marani 1998). Por otro lado, Sandoval y Müller (1992) encontraron que entre mayor fue el tamaño del explante utilizado ('Valery' o 'Grande Naine'), mayor fue la oxidación que se presentó en el medio de cultivo, mayor la pérdida por contaminación y menor el porcentaje de supervivencia; por ello afirman que el tamaño de explante es determinante en el éxito de la micropropagación y sugieren 5 mm como el ideal. Jarret *et al.* (1985) no tuvieron problemas con la supervivencia ni multiplicación acelerada al utilizar ápices vegetativos de 2-3 mm.

Se determinó que los resultados encontrados por Hamill *et al.* (2019) concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, donde se determinó que Foc no se transmite por multiplicación *in vitro* de ápices vegetativos pequeños (≤ 5 mm), y en este contexto se considera una técnica segura para la propagación de material libre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Esto podría deberse a que Foc se mueve dentro de la planta por medio del sistema vascular y es conocido que en las plantas monocotiledóneas los tejidos

vasculares no llegan al meristemo apical, estos se localizan en los tejidos adyacentes al tejido meristemático. Además, las células meristemáticas tienen una anatomía y una morfología muy particular y están estructuralmente densamente dispuestas y no dejan espacios intercelulares. Hay ausencia de plasmodesmos, unidades de citoplasma que se encargan de llevar también sustancias atravesando paredes celulares (Fahn 1974, Flores 2013), lo que dificulta que se encuentren bacterias y sobre todo hongos en tejidos meristemáticos. En consecuencia, es posible producir plantas libres de Foc mediante la técnica de micropropagación a partir de ápices vegetativos o florales de banano y otras musáceas.

Es de gran relevancia el conocimiento y la divulgación de los resultados de este estudio, debido a que la propagación *in vitro* de banano, plátano y otras musáceas es de uso común en el mundo.

LITERATURA CITADA

- Alabouvette, C; Lemanceau, P; Steinberg, C. 1993.** Recent advances in biological control of *Fusarium* wilt. *Pesticide Science* 37: 365-373.
- Berg, LA; Bustamante, M; 1974.** Heat treatment and meristem culture for production of virus-free bananas. *Phytopathology* 64: 320-322.
- Brandfass, C; Karlovsky, P. 2008.** Upscaled CTAB-Based DNA Extraction and Real-Time PCR Assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in Plant Material with Reduced Sampling Error. *Int. J. Mol. Sci.* 9(11): 2306-2321.
- Cox, E; Stotzky, G; Goos, R. 1960.** *In vitro* culture of *Musa balbisiana* colla embryos. *Nature* 185: 403-404.

- Diekmann, M; Putter, C. 1996.** Technical guidelines for the safe movement of *Musa* spp. germplasm. 3rd Edition. Bioversity International, Rome. 60 p.
- Dita, M; Barquero, M; Heck, D; Mizubuti, SGE; Staver, CP. 2018.** Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Front. Plant Sci.* 9: 1-21.
- Edel, V; Steinberg, C; Gautheron, N; Alabouvette, C. 2000.** Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* 104(5): 518-526.
- Faccioli G; Marani F. 1998.** Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. Pags. 346–380. *In* Plant virus diseases control. APS Press, The American Phytopathological Society.
- Fahn, A. 1974.** Anatomía Vegetal. Ediciones Blume. Madrid, España. 643 p.
- Flores, E. 2013.** La Planta. Estructura y Función. Cuarta Edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, C.R. 884 p.
- Forsyth, L; Smith, L; Aitken, E. 2006.** Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing Fusarium Wilt severity. *The British Mycological Society* 110(8): 929-935.
- García-Bastidas, F; Quintero-Vargas, J; Ayala-Vasquez, M; Schermer, T; Seidl, M; Santos.Paiva, M; Noguera, A; Aguilera, C; Wittenberg, A; Hofstede, R; Sorensen, A; Kema, G. 2020.** First report of Fusarium wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *APS Disease Notes* 104(3): 994.
- Garming, H; Roux, N; Van de Houwe, I. 2010.** The impact of the *Musa* International transit centre: Review of its services and cost-effectiveness and recommendations for rationalization of its operations. Bioversity International. Montpellier, France. 106 p.
- Hamill, SD. 2018.** Rapid progression of disease in susceptible and resistant banana cultivars inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 1 and Subtropical Race 4 in tissue culture. Pags. 749-756. *In* Proc. International Symposia on Tropical and Temperate Horticulture. Acta Hortic. 1205. Queensland, Australia.
- Hamill, S; Rames, E; Kristoffersen, J. 2019.** Clean Tissue cultures from Fusarium infected banana suckers. Abstract. *In* Australian Banana Industry Congress. Queensland, Australia.
- INIBAP. 2006.** Global conservation strategy for *Musa* (banana and plantain) INIBAP-IPGRI. 29 p.
- Jarret, R; Rodríguez, W; Fernández, R. 1985.** Evaluation, tissue culture propagation and dissemination of “saba” and “pelipita” plantains in Costa Rica. *Scientia Horticulture* 25: 137-147.
- Jiménez, D; Montes, M; Navas, J; Jiménez, R; Landab, B. 2010.** Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in plant and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. *Applied Soil Ecology* 46: 372-382.

- Kithaku, E; Muigai, A; Neondo, J; Mweu, C. 2019.** Screening of fungal contaminants in banana tissue cultures in Jkuat, Kenya. *African Journal of Microbiology Research* 13(29): 675- 688.
- Krikorian, A; Berquan, D. 1969.** Plant Cell and Tissue Culture: The role of Haberlandt. *Bot. Rev.* 35(1): 59-88.
- Kumari, A; Kumar, H. 2015.** Association of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* species with cultured shoot apices of banana (*Musa acuminata*) cultivars. *The Bioscan* 10(2): 629-633.
- Lassois, L; Lepoivre, P; Swennen, R; Van den Houwe, I; Panis, B. 2013.** Thermo-therapy, Chemotherapy, and Meristem Culture in Banana. Pags. 419-433. *In* *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology.* Cap 32. Humana-Press Springer. New Jersey, USA.
- Larkin, R; Hopkinsand, D; Martin, F. 1996.** Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpatogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease suppressive soil. *Phytopathology* 86(8): 812-819.
- Lin, YH; Jing, Y; Liu, ET; Chao, CP; Huang, JW; Pi-Fang, LC. 2009.** Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *Eur. J. Plant Pathol.* 123: 353-365.
- Lin, YH; Chen, K; Chang, J; Wan, Y; Hsu, C; Huang, J; Chang, PL. 2010.** Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan. *New Biotechnology* 27: 409–418.
- Ma, S; Shii, Ch. 1972.** *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science* 18: 135-142.
- Magee, CJP. 1940.** Pathological changes in the phloem and neighbouring tissue of the banana (*Musa cavendishii* Lamb.) caused by the bunchy top virus. Department of Agriculture New South Wales. *Sci Bull* 1939(67): 4-32.
- Mule, G; Susca, A; Stea, G; Moretti, A. 2004.** Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiology letters* 230(2): 235-240.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (15): 473-497.
- Ngomuo, M; Mneney, E; Ndakidemi, P. 2014.** The *in vitro* Propagation Techniques for Producing Banana Using Shoot Tip Cultures. *American Journal of Plant Sciences* 5(11): 1614-1622.
- Pegg, KG; Moore, NY; Bentley, S. 1996.** *Fusarium* wilt of banana in Australia: a review. *Australasian Journal of Agricultural Research* 47(5): 637-650.
- Ploetz, R; Pegg, KG. 2000.** *Fusarium* wilt. Pags. 143-159. *In* *Handbook of Diseases of Banana, Abaca and Enset.* CAB International.
- Ploetz, R. C. 2005.** Panama disease, an old nemesis rears its ugly head: part 1, the

- beginnings of the banana export trades. Plant Health Progress 6(1). Consultado en línea <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHP-2005-1221-01-RV>.
- Ploetz, R. C. 2015a.** Fusarium wilt of banana. Phytopathology 105(12): 1512–1521.
- Ploetz, R. C. 2015b.** Management of Fusarium wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4. Crop Prot. 73: 7–15.
- Ploetz, RC. 2018.** Fungal Diseases of the Root, Corm and Pseudostem. Pags. 207-228. In Handbook of Diseases of Banana, Abaca and Enset. CAB International. Wallingford, UK.
- Sánchez, M; Alfaro, F; Carr, C; Castillo, A; Delgado, J; Guzmán, M. 2019.** Escalas de severidad de marchitamiento por Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1) en plantas jóvenes de banano "Gros Michel" (*Musa* AAA) Sección de Fitoprotección, Dirección de Investigaciones CORBANA, Hoja divulgativa N° 15. Pococí, CR.
- Sandoval, J; Muller, L. 1992.** Influencia del tamaño del explante en la micropropagación *in vitro* de cuatro cultivares de *Musa* AAA. Turrialba 42(2): 243-248.
- Sandoval, J; Moncaleán, P. 2020.** Biotecnología aplicada para la micropropagación de banano, plátano y otras musáceas (*Musa* AAA, AAB). CORBANA San José, CR. 350 p. In Press.
- Sandoval, JA; Conejo, A; González, M; Guzmán, M; Muñoz, M; Carr, C. 2017.** Shoot tip culture or micropropagation: a safe technique for obtaining banana plants free of *Fusarium oxysporum*? Abstract. APS Phytopathology 107: S4.7.
- Sathiamoorthy, S; Uma, S; Selvarajan, R; Shyam, B; Singh, H. 2001.** Multiplication of virus free banana plants through shoot tip culture. National Research Centre of banana (ICAR). Tiruchirapalli, India. 35 p.
- Stover, RH. 1972.** Banana, Plantain and Abaca diseases. Commonwealth Mycological Institute, UK. 316 p.
- Stover, RH; Simmonds, NW. 1987.** Bananas. 3 ed. Longman Scientific and Technical. Harlow, UK. 468 p.
- Suman, S. 2017.** Plant tissue culture: a promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. Biochem. Cell. Arch. 17(1): 1-26.
- Sun, E; Su, H; Ko, W. 1978.** Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 from soil or host tissue by cultural characters. The APS. Phytopathology 68(11): 1672-1673.
- Swamy, D; Sahijram, L. 1989.** Micropropagation of banana from male floral apices culture *in vitro*. Scientia Horticulturae 40(3): 181-188.
- Tchatchambe, N; Ibanda, N; Adheka, G; Onautshu, O; Swennen, R; Dhed'a, D. 2020.** Production of banana bunchy top virus (BBTV)-free plantain plants by *in vitro* culture. African Journal of Agricultural Research 15(3): 361-366.

- Thomas, J. 2015.** Technical guidelines for the safe movement of *Musa* germplasm MUSANET-Bioversity International, CGIAR. 60 p.
- Thomas, P; Soly, T. 2009.** Endophytic Bacteria Associated with Growing Shoot Tips of Banana (*Musa* sp.) cv. "Grand Naine" and the Affinity of Endophytes to the Host. *Microb. Ecol.* 58(4): 952-964.
- Van Den Houwe, I; Panis, B. 2004.** Banana cell and tissue culture. Review strosse, Laboratory of Tropical Crop Improvement. Catholic University of Leuven, Belgium. 12 p.
- Vuylsteke, D. 1989.** Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. IBPGR. Rome, Italy. 59 p.
- Warman, M; Aitken, E. 2018.** The Movement of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-9.
- Wei, W; Xu, YL; Li, S; Liu, JB; Han, XZ; Li, WB; Ji, P. 2012.** Analysis of *Fusarium* populations in a soybean field under different fertilization management by Real-Time quantitative PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Plant Pathology* 94(1): 119-126.
- Zapata, S; Henao, M; Patiño, L; Sánchez, J; Hoyos-Carvajal, L. 2019.** Fungal endophytes in bananas cv Manzano affected by *Fusarium*. *African Journal of Agricultural Research* 14(7): 430-438.