

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADUADOS**

**“SELECCIÓN DE VITROPLANTAS PROVENIENTES DE MICROSECCIONES
DE BANANO DE LA VARIEDAD GROS MICHEL (AAA)
RESISTENTES A LA RAZA1 DEL MAL DE PANAMA
(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)”**

POR

JEANETTE MARÍA CÁRDENAS CHACÓN

CATIE

Turrialba, Costa Rica
2001

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADUADOS

**“SELECCIÓN DE VITROPLANTAS PROVENIENTES DE
MICROSECCIONES DE BANANO DE LA VARIEDAD GROS MICHEL
(AAA) RESISTENTES A LA RAZA 1 DEL MAL DE PANAMA
(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)”**

POR

JEANETTE MARÍA CÁRDENAS CHACÓN

Turrialba, Costa Rica,

2001

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADUADOS

“SELECCIÓN DE VITROPLANTAS PROVENIENTES DE
MICROSECCIONES DE BANANO DE LA VARIEDAD GROS
MICHEL (AAA) RESISTENTES A LA RAZA 1 DEL MAL DE
PANAMA (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)”

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Postgraduados, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito parcial para optar al grado de:

Magíster Scientiae

por:

JEANETTE MARÍA CÁRDENAS CHACÓN

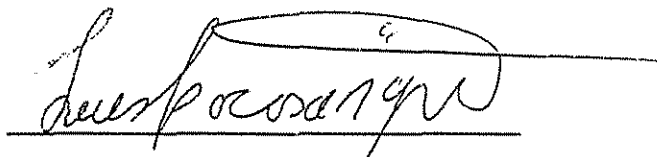
Turrialba, Costa Rica,

2001

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Postgraduados del CATIE y aprobada por el Comité Consejero de la estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGÍSTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



Luis E. Pocasangre E. Ph. D.
Consejero Principal



Franklin E. Rosales, Ph. D.
Miembro Comité Consejero



Alba Stella Riveros Angarita, Ph. D.
Miembro Comité Consejero



Al Moslemi, Ph. D.
Director y Decano de la Escuela de Postgraduados



Jeanette María Cárdenas Chacón
Candidata

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por permitirme vivir cada experiencia de esta vida que me regaló.

A mi hijo Jesús Alfredo el mejor de los amigos, ser especial que llego a llenar mi existencia de alegría, de sabiduría, de amor, mi constante inspiración.

AGRADECIMIENTOS

A Jesús Alfredo por su compañía, amor, apoyo, comprensión y por haber asumido el reto en esta gran experiencia.

A Felipe de Jesús, hombre honesto y sabio, único en su género, gracias papá.

A mamá Azucena por su incondicionalidad y amistad.

A mis hermanos, Ana Yudith, Pablo Gerardo, Jorge Enrique; Mixalis, Luis Felipe y Jesús Manuel, por sus alegrías, sus oraciones y buenos deseos.

A mis sobrinos, Stephanía, Jorge Enrique y Adriana Daniela, por sus sonrisas y amor.

A mi madre Rosario, por su apoyo y ejemplo de tenacidad.

Al Dr. Luis Ernesto Pocasangre E., por su excelente orientación en el proceso de investigación y aporte de valiosos conocimientos.

Al Dr. Franklin Rosales, por sus consejos y recomendaciones en esta investigación.

A la Dra. Alba Stella Riveros, por su contribución durante el desarrollo de la investigación.

A mis amigas y amigos, compañeros de esta experiencia por aportar sus mejores momentos.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
SUMMARY	
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2. OBJETIVOS.....	4
1.2.1. Objetivo General	4
1.2.2. Objetivos Específicos	5
1.3. HIPÓTESIS	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. EL BANANO	6
2.2. DISTRIBUCION DEL MAL DE PANAMA Y DESCRIPCIÓN DE LAS RAZAS DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	7
2.2.1. Factores Agroclimáticos	8
2.2.2. Penetración y traslocacion del hongo en la planta	9
2.2.3. Síntomas de la enfermedad	10
2.2.4. Diseminación	13
2.2.5. Impacto económico de la enfermedad	14
2.3. CONTROL DE LA ENFERMEDAD	14
2.3.1. Control Cultural	15
2.3.2. Control Biológico	16
2.3.3. Cultivo de Tejidos y Variación Somaclonal	19
2.3.4. Mejoramiento Genético	22
2.3.5. Inducción de Resistencia	24
3. MATERIALES Y METODOS	31
3.1. UBICACIÓN GEOGRAFICA	31
3.2. AISLADOS DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	32
3.3. MATERIAL VEGETAL	33
3.3.1. Clones Seleccionados	33
3.3.2. Producción de Microsecciones	33
3.4. PREPARACION DEL EXTRACTO DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	34
3.4.1. Concentración de los tratamientos	35
3.5. ETAPA 1 DE LABORATORIO	
3.5.1. Fase 1 efecto del extracto crudo de FOC sobre microsecciones.....	36
3.5.2. Diseño experimental	37

3.5.3. Modelo matemático	38
3.5.4. Distribución de los tratamientos	38
3.6. FASE II EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC) SOBRE EL CRECIMIENTO DE VITROPLANTAS.....	40
3.7. ETAPA II. EVALUACION DE LINEAS RESISTENTES EN CONDICIONES DE INVERNADERO	42
3.7.1. Obtención de la suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	42
3.7.2. Material vegetal: Vitroplantas resistentes	43
3.7.3. Diseño experimental	45
3.7.4. Modelo Matemático	46
3.7.5. Distribución de los tratamientos etapa II.....	46
3.9. ESTUDIOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE EXTRACTO CRUDO DE FOC	48
3.9.1. Análisis cualitativo de la presencia de metabolitos secundarios en extractos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	48
3.9.1.1. Preparación muestra	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1. EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE FOC SOBRE MICROSECCIONES	51
4.2. EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC) SOBRE EL CRECIMIENTO DE VITROPLANTAS	55
4.3. BIOENSAYO CON LINEAS RESISTENTES EN CONDICIONES DE INVERNADERO	59
4.4. ANALISIS CUALITATIVO DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN LOS EXTRACTOS DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	67
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
5.1. CONCLUSIONES	73
5.2. RECOMENDACIONES	76
6. BIBLIOGRAFÍA	77
7. ANEXOS	98

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Razas conocidas de <i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i> cubense</i>	8
Cuadro 2. Efecto del extracto crudo de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> FOC sobre la emisión de brotes laterales en microsecciones de tres variedades de banano	54
Cuadro 3. Efecto del extracto crudo aislados A y B de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> FOC sobre el crecimiento de vitroplantas	58
Cuadro 4. Efecto de los aislados A y B de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> de sobre el crecimiento de plántulas en vivero	67
Cuadro 5. Datos de análisis de Metabolitos Secundarios	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas externos e internos del Mal de Panamá causados por el Hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cabense</i> en Gros Michel (AAA).....	12
Figura 2. Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cabense</i> (FOC) en medio PDA	33
Figura 3. Protocolo para la obtención del extracto crudo de FOC, en medio líquido CZAPEK DOX	36
Figura 4. Protocolo de inoculación de microsecciones y selección de brotes resistentes al extracto crudo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cabense</i> (FOC)	38
Figura 5. Protocolo de inoculación y evaluación de vitroplantas sometidas al extracto crudo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cabense</i> (FOC)	42
Figura 6. Protocolo de Inoculación de plántulas provenientes de bioensayo 2 con suspensión de esporas de 1×10^5 cfu/ml de FOC	46
Figura 7. Efecto del extracto crudo de FOC sobre la brotación de microsecciones de la variedad Gros Michel (AAA)	53
Figura 8. Efecto del extracto crudo de FOC sobre el amarillamiento y de tres cultivares de banano	60
Figura 9. Efecto del extracto crudo de FOC sobre la marchitez y de tres cultivares de banano	61
Figura 10. Porcentaje de incidencia de los aislados Ay B en tres cultivares de banano al culminar el ensayo.....	62
Figura 11. Efecto del extracto crudo de FOC sobre decoloración de corno en tres cultivares de banano	64

Figura 12. Planta de la variedad Gros Michel (AAA) totalmente afectada por la toxicidad de la suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	64
Figura 13. Efecto del aislado B de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> sobre la Incidencia de la enfermedad en plantas de Gros Michel (AAA)	65
Figura 14. Resistencia del cultivar Gran Enano (AAA) al efecto del aislado B de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	65
Figura 15. Gráfica de cromatografía de alta eficiencia (HPLC) de los extracto crudo de los aislados A y B de FOC.....	71

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio PDA para el cultivo del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	98
Anexo 2. Composición química del medio para el cultivo de <i>Musa</i> sp. basado en sales de Murashige y Skoog, utilizadas rutinariamente, en el Laboratorio de Biotecnología de CATIE.....	99
Anexo 3. Preparación de medio Murashige y Skoog (MS) empleado en multiplicación de <i>Musa</i> sp.	99
Anexo 4. Composición química del medio Czapek DOX	100
Anexo 5. Preparación de medio Czapek DOX para obtención del extracto crudo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	99
Anexo 6. Efecto del aislado A y B de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC), sobre la incidencia y severidad del Mal de Panamá en tres cultivares de <i>Musa</i> en condiciones de Invernadero.....	102
Anexo 7. Efecto del aislado A y B de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC), sobre la severidad interna del Mal de Panamá en tres cultivares de <i>Musa</i> en condiciones de Invernadero	103
Anexo 8. Análisis de Varianza de la brotación de microsecciones de corno de tres variedades de banano inoculadas extracto crudo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	104

Anexo 9. Análisis de Varianza de peso de raíces de vitroplantas en tres variedades de banano inoculadas con extracto crudo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	104
Anexo 10. Análisis de Varianza de peso de hojas de vitroplantas en tres variedades de banano inoculadas con extracto crudo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	105
Anexo 11. Análisis de Varianza de la marchitez de plántulas en tres variedades de banano inoculadas con suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	105
Anexo 12. Análisis de Varianza del amarillamiento de plántulas en tres variedades de banano inoculadas con suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	106
Anexo 13. Análisis de Varianza de la severidad interna en plántulas de tres variedades de banano inoculadas con suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	106
Anexo 14. Análisis de Varianza de la incidencia en plántulas de tres variedades de banano inoculadas con suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC)	107

CARDENAS CHACON, J. E. 2001. SELECCIÓN DE VITROPLANTAS PROVENIENTES DE MICROSECCIONES DE BANANO DE LA VARIEDAD GROS MICHEL (AAA) RESISTENTES A LA RAZA 1 DEL MAL DE PANAMA *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Palabras claves: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Banana, Gros Michel (AAA), Gran Enano (AAA), resistencia, microsecciones, extracto crudo, vitroplantas.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), como sustancia de selección sobre la brotación de microsecciones de corno y así como su efecto en el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas en estado III a nivel *in vitro*. La inoculación de microsecciones y vitroplantas con concentraciones de 40 y 60 % extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, permitió detectar una selección temprana significativa de vitroplantas resistentes al patógeno, sin embargo, concentraciones de 80 y 100 % causó una baja proliferación de microsecciones de corno y desarrollo de vitroplantas de la variedad Gros Michel (AAA). El efecto tóxico de altas concentraciones del extracto crudo del hongo indican que no son apropiadas para ser utilizadas como sustancias de selección de resistencia al Mal de Panamá. Ninguna concentración del extracto crudo de 20 - 100% de aislado A y B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) redujo la brotación de las microsecciones y crecimiento de vitroplantas en el cultivar resistente Gran Enano (AAA).

En condiciones de invernadero, la incidencia de la enfermedad en el cultivar susceptible Gros Michel (AAA) fue 75% inferior en plantas preseleccionadas a nivel *in vitro* bajo concentraciones de 40 y 60%, que en plantas que no fueron preseleccionadas con el extracto crudo del hongo. La severidad de los síntomas externos de la enfermedad, correspondientes a amarillamiento y marchitez de las plantas fueron inferiores en plantas preseleccionadas bajo concentraciones de 40 y 60% del extracto crudo del hongo que plantas que no fueron preseleccionadas. En el cultivar susceptible Gros Michel (AAA), la severidad de los síntomas internos, correspondientes a decoloración del corno fue 70 % inferior en plantas preseleccionadas con concentraciones del extracto crudo que en las plantas control. Estos resultados demostraron que la resistencia inducida por el extracto crudo del hongo en condiciones *in vitro*, se mantiene y expresa en condiciones *in vivo*, lo cual indica que la técnica de microsecciones puede ser una herramienta útil para la detección temprana de resistencia en genotipos de *Musa* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC)

CARDENAS CHACON, J. E. 2001. Selection of vitroplants originated from banana microsections of Gros Michel (AAA) cultivar for resistance to race 1 of Panamá disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)

Key words: : Gros Michel (AAA), *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Panama disease, microsections, vitroplants, crude filtrates, resistance, selection, preselected plants, disease incidence, and disease severity

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) crude filtrates as selection substances for proliferation of banana corm microsections, as well as its effect on growth and development of stage III vitroplants under *in vitro* conditions. Inoculation of microsections and vitroplants with 40 and 60% FOC crude filtrate concentrations was effective to detect an early selection of resistant vitroplants to the pathogen. However, 80 and 100% crude filtrate concentrations caused a significant reduction on microsections proliferation as well as on vitroplants growth and development of susceptible Gros Michel(AAA) cultivar. This toxic effect of high crude filtrate concentrations indicates that these concentrations are not useful for *in vitro* selection of disease resistance under *in vitro* conditions. On the other side, on the resistant cultivar Gran Enano (AAA) non- toxic effects of both A and B isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* were observed on microsections proliferation and vitroplants growth.

Under nursery conditions, disease incidence on Gros Michel (AAA) cultivar was 75% lower for preselected plants with 40 and 60% FOC crude filtrates than for not treated plants. In addition, disease severity on Gros Michel (AAA) cultivar corresponding to plants yellowing and wilting was lower for preselected plant with 40 and 60% crude filtrates than for control plants. Severity of internal symptoms assessed as corm discoloration percentage was 70% lower for preselected plants with 40 and 60% concentrations than for control plants. These results demonstrated that induced resistance of fungus crude filtrates under *in vitro* conditions is reproducible under nursery conditions, indicating that this microsections technique could be used as an early detection tool for *Musa* genotypes resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

1.INTRODUCCIÓN

El banano, planta anual herbácea nativa del Sureste de Asia, constituye uno de los principales cultivos dentro del sistema de producción agrícola, que se refleja en su incremento en la producción de un 70 % desde 1970 a 1997 (Frison y Sharrock, 1998). Los bananos son cultivados en mas de 100 países, por cuanto, es un ingrediente importante en la dieta básica de alrededor de 400 millones de personas y en la economía de varios países de las zonas tropicales e intertropicales del mundo, en los que hay aproximadamente 10 millones de hectáreas en donde se producen alrededor de 88 millones de toneladas año, la tercera parte proveniente de Sudamérica, Centroamérica y el Caribe (Frison y Sharrock, 1998; Perea, 1998; FAO, 2001).

El Mal de Panamá, causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), es una de las enfermedades más devastadoras que ha afectado la producción comercial de bananos, variedad Gros Michel (AAA), en América Central y Sudamérica. Durante la década de 1960, aproximadamente 40.000 ha del clon fueron destruidas por la enfermedad del Mal de Panamá, y las plantaciones fueron abandonadas a lo largo de África y América (Stover, 1962). Como consecuencia se seleccionaron tierras nuevas o suelos vírgenes para establecer las nuevas áreas de producción (Stover, 1986). Sin embargo, estas nuevas plantaciones fueron atacadas por *Fusarium* por lo que la variedad Gros

Michel (AAA) tuvo que ser reemplazada, demostrando el alto peligro inherente en los monocultivos. Por los años sesenta, las producciones de Gros Michel (AAA) ya se habían sustituido por el subgrupo de Cavendish (AAA). (Stover, 1986; Rowe, 1990; Ploetz, 1994; Rowe y Rosales, 2000; Ploetz y Pegg, 2000).

Actualmente, se conocen 4 razas de FOC capaces de atacar a las musáceas. La Raza 1, responsable de la destrucción de más de 40.000 ha. del cultivar comercial Gros Michel (AAA) en Centroamérica, ataca a la mayoría de los cultivares de postre a excepción de los cultivares del subgrupo Cavendish (AAA) (Stover, 1962; Stover y Simmonds, 1987; Ploetz y Pegg, 2000). La raza 2, ataca los bananos de cocción tipo Bluggoe (ABB) y la mayoría de los cultivares de consumo local tales como: Chato (ABB), Pisang Awak (ABB), Pome (ABB), Pelipita (ABB) y Saba (ABB) (Stover, 1962; Ploetz, 1994; Jones, 2000). La raza 3, ataca mayormente a las *Heliconias* spp. (Waite, 1977). Finalmente, la Raza 4 presente en Taiwán (Sun *et al.*, 1978; Hwang, 1999), en África (De Beer y Visser, 1994; Buddenhagen, 1990), en Australia (Bertley, 1999; Tang y Hwang, 1994; Tang y Hwang, 1998), y en las Filipinas (Danielles y Smith, 1993; Magnaye, 1999). A la fecha, no ha sido reportado en el continente americano; no obstante, por ser capaz de atacár a los cultivares del subgrupo Cavendish, lo cual constituye una amenaza para las plantaciones comerciales de Latinoamérica (Stover, 1986; Ploetz, 1994; Ploetz y Pegg, 2000).

La variedad Gros Michel (AAA), es un clon alto y fue el primer banano sembrado en plantaciones para exportación (Stover, 1962; Stover, 1986; Ellis 1983). A pesar de su susceptibilidad a la marchitez por *Fusarium*, todavía se consume en muchos países alrededor del mundo debido a su calidad superior, y se considera que es el cultivar de banano de más alta calidad de fruta . Actualmente existe una importante producción de Gros Michel (AAA) que está siendo cultivada bajo el sistema de agricultura orgánica en asocio con cacao y café en la zona de Talamanca, Costa Rica y, donde *Fusarium* es un grave problema (Umaña *et al.* 2000).

La marchitez por *Fusarium* representa un serio problema para muchos cultivares de banano y sigue siendo una de las enfermedades en musáceas más difíciles de manejar debido a la carencia de controles químicos eficientes (Ploetz, 1994). Consecuentemente, diferentes metodologías han sido usadas para controlar la enfermedad tales como, control cultural mediante el barbecho inundado y utilización de medidas cuarentenarias. Así mismo la aplicación del mejoramiento genético mediante la incorporación de genes resistentes (Crouch, 2000; Sagi *et al.* 1994; Sagi *et al.* 1995; Bosque- Pérez, *et al.* 1998; Remy *et al.* 1998). Existe un consenso general de que la única forma de control efectiva para esta enfermedad sea la resistencia del hospedero (Moore, *et al.*, 1995; Sagi *et al.*, 1994; Bosque- Pérez, *et al.*1998). Es factible encontrar fuentes naturales de resistencia en especies y cultivares silvestres (Moore *et al.* 1995).

La utilización de herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos en combinación con técnicas de selección fitopatológicas, constituyen alternativas para la búsqueda de resistencia a la marchitez causada por *Fusarium*, (Escalant,1990; Escalant *et al.*, 1994a). La obtención de variedades resistentes al Mal de Panamá mediante la utilización de plantas provenientes de ensayos de variación somaclonal es también una alternativa (Hwang, 1986; Hwang y Ko, 1987; Hwang, 1991). Matsumoto *et al.* (1999), realizó selección *in vitro* de plantas de banano resistentes al Mal del Panamá, inoculando las plántulas del cultivar Manzano (AAB) con concentraciones del extracto crudo de raza 1 de FOC, observándose en esta experimentación diferentes niveles de resistencia a la enfermedad. Consecuentemente la selección temprana de vitroplantas provenientes de microsecciones de cormos, sometidas a diferentes sustancias de selección contenida en el extracto crudo producidos por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* representa una nueva vía para búsqueda de líneas resistentes de Gros Michel a la raza 1 del Mal de Panamá.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Seleccionar vitroplantas de banano variedad Gros Michel (AAA), con resistencia a la Raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC).

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Adaptar y evaluar el efecto de las concentraciones de extracto crudo de FOC como sustancias de selección de plantas resistentes al Mal de Panamá
- b) Determinar la permanencia de la resistencia de las líneas seleccionadas a nivel *in vitro*, bajo presiones del hongo en bioensayos a nivel de invernadero.
- c) Realizar análisis cromatográficos para identificar las sustancias tóxicas presentes en el extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) responsables de producir la enfermedad en la planta.

1.3 HIPOTESIS

- Existen determinadas concentraciones de extracto crudo de FOC que permitirá detectar gradientes de resistencia en vitroplantas de banano.
- Las líneas resistentes seleccionadas bajo condiciones *in vitro* expresarán el grado de resistencia bajo presiones del hongo en bioensayos a nivel de invernadero.
- El extracto crudo de cada aislado contiene sustancias tóxicas específicas que causan respuestas fisiológicas diferentes en los cultivos analizados.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 EL BANANO

El cultivo del banano tiene un origen posible en Malasia que a su vez se considera centro de origen de los bananos comestibles (May y Plaza, 1958; Haarer, 1964). El valor energético de la fruta, su aporte es similar al del maíz (300 kcal por 100 g de producto deshidratado o bien, una caloría por gramo de fruta fresca), además posee un bajo nivel de fibra cruda, que lo hace apto para el consumo humano (UPEB 1978) Estudios realizados en Uganda reflejaron que 3,6 Kg. de banano suplen de 3.600 calorías por persona, cantidad necesaria para suplir los requerimientos alimentarios (Simmonds, 1973). Los productos que pueden elaborarse a partir de banano son varios, tales como: harina, almidón, rebanadas tostadas, dulces y saladas, hojuelas, pan, esencias, vino, puré, etc., que le dan al banano mayor valor agregado e importancia en la dieta del ser humano.

Uno de los cultivares de mayor importancia por su calidad de fruta en cuanto a sabor y aroma es la variedad Gros Michel (AAA), la cual constituyó la variedad que más se explotó comercialmente entre los años de 1900 a 1960 (Stover, 1962; Simmonds, 1962; Simmonds, 1997). Sin embargo, fue excluida de las producciones para exportación por su alta susceptibilidad al Mal de Panamá causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Stover, 1962; Stover, 1986; Ellis 1983).

2.2 DISTRIBUCION DEL MAL DE PANAMA Y DESCRIPCION DE LAS RAZAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC).

El Mal de Panamá fue reportado por primera vez en Australia en 1874. En la actualidad, se encuentra en todas las zonas de producción bananera excepto en las Islas del Pacífico Sur: Papua Nueva Guinea y otras islas tales como, Borneo; además, en la República de Somalia y en países bordeados por el Mediterráneo (Stover, 1987). La Enfermedad fue por primera vez descrita en Australia en 1874 (Brancoft, 1876, citado por Stover, 1987). De 1900 a 1960 el Mal de Panamá fue estudiado con intensidad en las extensas plantaciones utilizadas para la producción para exportación en América Tropical (Stover, 1962). Durante este tiempo la producción estuvo basada exclusivamente en la variedad de *Musa* spp. Gros Michel (AAA) , la cual, es altamente susceptible a la Raza 1 (Stover, 1987; Ploetz, 1994).

Se reconocen cuatro razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (ver cuadro 1) (Stover, 1962; Stover, 1986; Ploetz y Pegg, 2000). Tres de ellas son patogénicas de Musaceas (Stover, 1990). La Raza 1 se encuentra en la mayor parte de las regiones cultivadas de banano y, es altamente patogénica de muchos cultivares de postre incluyendo Silk y Pome (AAB) y Gros Michel (AAA) . La Raza 2, ataca los bananos de cocción tipo Bluggoe y la mayoría de los cultivares de consumo local, tales como: Chato (ABB), Pisang Awak (ABB), Pome (ABB), Pelipita (ABB) y Saba (ABB). La Raza 3 afecta principalmente a las *Heliconias* spp. (Waite 1977).

Mientras que, la raza 4, ataca a los cultivares del subgrupo Cavendish lo que la constituye en una amenaza para las plantaciones comerciales de Latinoamérica (Stover, 1986; Ploetz y Correl, 1988; Ploetz, 1994; Stover, 1962; Ploetz y Pegg, 2000).

Cuadro 1. Razas conocidas de *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* (Stover, 1986).

RAZA	VARIETADES ATACADAS
Raza 1	Gros Michel (AAA) (AAA), Apple (AAB), Silk (AAB), Taiwán, Latundan (AAB), IC2 (AAAA)
Raza 2	Bluggoe (ABB) y tetraploides (AAAA)
Raza 3	<i>Heliconia</i> spp.
Raza 4	Todas las variedades (AAA), Cavendish, Taiwán, Latundan (AAB), Gros Michel (AAA) , Pisan lilin (AA), Bluggoe (AAB), y todos los tetraploides.

2.2.1 FACTORES AGROCLIMATICOS

Existen varios factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad. El cultivar de banano es de primordial importancia, aún cuando existen otros aspectos, tales como el drenaje, las condiciones ambientales y el tipo de suelo. La supervivencia del hongo, así como su crecimiento y esporulación son mayores en suelos de textura fina francos y franco-arcillosos que en suelos arcillosos pesados y un pH de 7,2 a 8. El micelio y los conidios sobreviven sólo durante poco tiempo en suelos muy secos, pero las clamidiosporas sobreviven aproximadamente por 30 años (Pegg y Langdon, 1987a). A medida que la humedad del suelo se acerca a su

punto de saturación, como ocurre durante las inundaciones, el hongo vive en la superficie del suelo por lo menos 2 a 3 meses, pero muere a mayores profundidades debajo de la superficie. Se estima que la inundación por más de 18 meses destruye el hongo que está en el suelo (Ploetz, 1989; Ploetz *et al.* 1989; Ploetz, 1990; Ploetz y Pegg, 1997).

2.2.2 PENETRACION Y TRASLOCACIÓN DEL HONGO EN LA PLANTA

El hongo penetra en la planta de banano a través de las raíces y cormos dañados en particular a través de las raicillas. El hongo llega a los vasos del xilema sé trasloca desde las raíces hasta la parte superior del Seudotallo (Beckman y Talboys, 1990). *Fusarium*, coloniza los vasos del rizoma, destruyendo yemas laterales y sé trasloca a lo largo de los haces vasculares hacia otras partes del rizoma en las vainas foliares del seudotallo, posteriormente a las partes aéreas de la planta y finalmente a las hojas (Pegg y Langdon, 1987b; Ploetz, 1992).

El hongo desarrolla en los vasos del xilema varios microconidios que son llevados hacia la parte superior de la planta e inician nuevas zonas de infección a lo largo de los haces vasculares. Las sustancias tóxicas tales como enzimas y demás sustancias que secreta el hongo; así como, la planta como respuesta a la infección, ocasionan una decoloración y obstrucción de los haces vasculares, lo

que provoca al marchitamiento y muerte de la planta. (Beckman y Talboys, 1981; Beckman y Talboys, 1990; Ploetz y Pegg, 1997).

El hongo produce microconidios constituidos por una o dos células en los vasos del xilema y tanto microconidios como macroconidios en forma de hoz de cuatro a varias células, en esporodoquios que produce sobre hojas y pecíolos de plantas marchitas o muertas. Estas esporas son diseminadas por el viento o el agua, su período de vida es corto. Las clamidiosporas en cambio pueden vivir en forma saprofítica (Beckman y Talboys, 1981; Beckman y Talboys, 1990; Ploetz, 1990; Ploetz y Pegg, 1997).

2.2.3 SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD

Los síntomas externos se caracterizan por un amarillamiento de las hojas más viejas o un agobamiento, en la unión del pecíolo con elseudotallo. Puede o no manifestarse un agrietamiento en la base delseudotallo (Ploetz y Pegg, 1997; Beckman y Talboys, 1990). En sus inicios se puede confundir este síntoma con deficiencia de potasio, especialmente bajo condiciones de sequía o frío (Moore, *et al.*, 1995) Todas las hojas eventualmente se agobian y mueren, pero elseudotallo permanece erecto por uno o dos meses hasta que se pudre y se seca. Elseudotallo adquiere una consistencia dura y seca (Beckman y Talboys, 1981; Beckman y Talboys, 1990; Ploetz y Pegg, 1997). Los síntomas internos consisten

en una decoloración vascular solamente en las vainas externas o en estado muy avanzados, puede alcanzar hasta las vainas internas, el tallo verdadero y aun el pedúnculo de la fruta, la cual no presenta síntomas de la enfermedad. (Pegg y Langdon, 1987a; Moore, *et al.*, 1995).

El desarrollo de la planta no es detenido por la infección y las hojas que emergen son, por lo general mas descoloridas que las de una planta sana. La lámina de las hojas nuevas puede reducirse en forma apreciable, así como mostrar arrugas y deformaciones (Fig. 1a). Una planta de banano susceptible, infectada por FOC, difícilmente se recupera. Sin embargo, esta puede presentar un desarrollo escaso por algún tiempo y producir hijuelos infectados antes de morir, no se han observado síntomas de la enfermedad en los frutos (Su *et al.*, 1986; Stover 1987; Moore, *et al.*, 1995).

Los síntomas internos en el corno son parecidos al del seudotallo. Se suelen presentar una serie estrías necróticas, oscuras o azuladas, sobre fondo blanco (Fig. 1). Es frecuente en plantas con ataque inicial que la necrosis no afecte al corno, aunque esté extendida en pecíolos y falso tallo. Los síntomas en las raíces no se presentan diferencias definidas entre raíces sanas y raíces enfermas. El estado sanitario de las raíces es bueno, si los nemátodos están bien controlados (Beckman y Talboys, 1990; Mendes *et al.* 1993; Ploetz y Pegg, 1997).

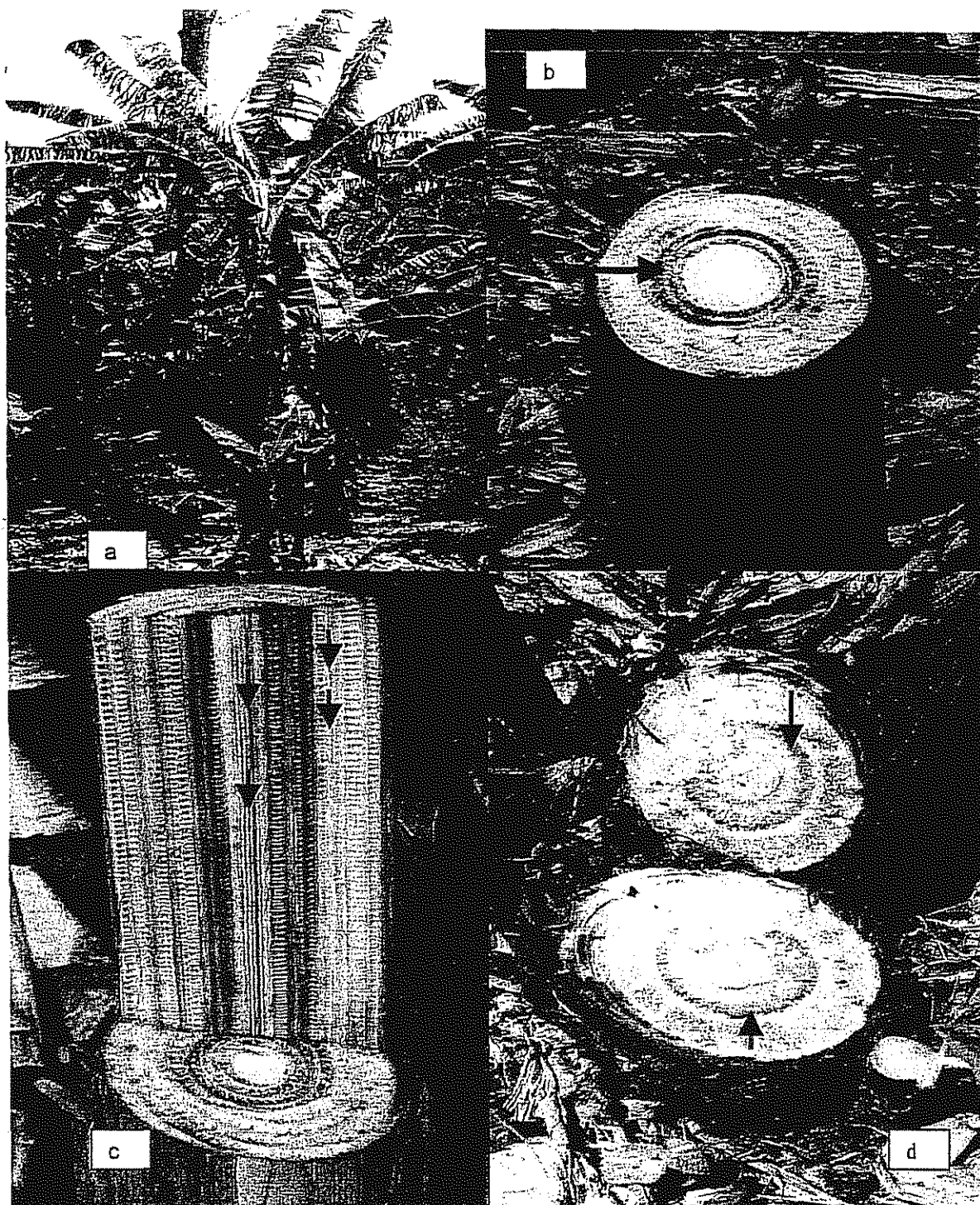


Fig 1 Síntomas externos e internos del Mal de Panamá causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* en el cultivar Gros Michel (AAA). a) Amarillamiento hojas medias y bajas b) Corte transversal del seudotallo, se observa decoloración interna c) Corte longitudinal del seudotallo, decoloración vascular del seudotallo d) Corte transversal del cormo decoloración interna y anillo formado por el hongo. Fotos L. Pocasangre, 2001.

2.2.4 DISEMINACIÓN

La enfermedad se transmite frecuentemente por cormos de plantas infectadas, utilizados para iniciar nuevas plantaciones o para replantar áreas establecidas. Dentro de una parcela, la enfermedad se propaga de una planta a otra por el suelo y a través de las raíces. La vía normal es que el hongo penetre por las raicillas laterales, que están sobre las raíces más viejas, y de éstas pase al rizoma. También el hongo puede penetrar por las raíces muertas o por las raíces heridas, de las cuales pasará al cormo (Ploetz y Pegg, 2000).

En suelos pesados o arcillosos, que retienen el exceso de agua y que provocan condiciones de hipoxia en el suelo, se favorece el desarrollo de infecciones en las raíces sanas, por encontrar un exceso perjudicial de anhídrido carbónico originado por la respiración; aunque, la raíz principal es poco afectada, las raicillas laterales se infectan y posteriormente mueren. Esta infección de las raíces permite que se presente condiciones óptimas para que el patógeno que se encuentra en el suelo penetre fácilmente a las raíces e invada el sistema radicular y enferme la planta (Ploetz, 1989; Aguilar *et al.* 1999; Jones, 2000).

2.2.5 IMPACTO ECONOMICO DE LA ENFERMEDAD

El Mal de Panamá trajo como consecuencia una transformación total en la forma en como se realizaba la producción y comercialización de banano. Para afrontarlo fue necesario realizar altas inversiones económicas en la renovación de las plantaciones cambiando Gros Michel (AAA) por las variedades resistentes del subgrupo Cavendish. Así mismo, se incrementó la utilización de mano de obra, tipo de empaque para exportación etc. Las variedades del subgrupo Cavendish ocupan ahora el 30 % de las áreas cultivadas por banano. La enfermedad causa una reducción alta de la producción de banano, trayendo consigo graves consecuencias para un gran sector que depende de este cultivar (Stover, 1990).

2.3 CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Hasta ahora no se conoce un tratamiento químico para el Mal de Panamá. Sin embargo, existen prácticas culturales para evitar el desarrollo y la propagación de la enfermedad. Estas medidas de lucha deben ir encaminadas a aumentar el vigor de la planta para darle una mayor resistencia al ataque del hongo y, por otra parte, crear en el suelo un ambiente desfavorable al desarrollo del patógeno (Jones, 2000). Herbert y Marx (1990), reportaron una reducción de la incidencia de la enfermedad, cuando fumigaron el suelo con bromuro de metilo, sin embargo

tres años después de la fumigación, las áreas fueron de nuevo re infectadas con el patógeno.

En Australia, por medio de inyección en el seudotallo de 20 % de fosfanato de potasio para controlar la enfermedad en cultivar del subgrupo "Williams" pero los resultados fueron erráticos (Ploetz y Pegg, 2000). Estos resultados podrían ser explicados por la susceptibilidad del FOC y porque el fosfanato es reducido a concentraciones de fosfato que es un proceso que se da naturalmente en las plantas de banano (Davis, *et al.* 1994). Lakshman *et al.* (1987), reportaron que la inyección de rizomas con 2 % de carbendacín (Bavistín 50 WP), protegió la variedad Rastali (AAB, Syn. SILK), por un ciclo de producción; mientras que este tratamiento no tuvo ningún efecto cuando fue aplicado en Sur África (Herbert y Marx, 1990).

2.3.1 CONTROL CULTURAL

Debido a que la enfermedad no puede ser controlada mediante la aplicación de productos químicos, los métodos culturales son los más utilizados hasta la fecha. La práctica cultural mas extensiva aplicada en los años 60 para el control de la enfermedad fue el barbecho inundado, pero resulto ser muy costosa dada la alta inversión en los canales de riego.(Stover 1962); Otro método utilizado, es la rotación de cultivos y el uso de enmiendas orgánicas tal como la gallinaza, que no

han sido efectivas para el control de la enfermedad (Moore, *et al.* 1995; Pegg y Langdon, 1987a). La utilización de plantas sanas provenientes de cultivo de tejidos es una buena práctica para evitar la diseminación del hongo, sin embargo en suelos contaminados con *Fusarium*, las vitroplantas son más susceptibles que las plántulas provenientes de cormos (Smith *et al.* 1998). La cuarentena y la eliminación de plantas enfermas son prácticas efectivas para controlar la enfermedad puesto que restringen el movimiento de cormos, hijuelos y suelo, que podrían transportar el patógeno de regiones infestadas a áreas limpias (Moore, *et al.* 1995; Pegg y Langdon, 1987b). Otra práctica usada, ha sido la esterilización por calentamiento del suelo, esta practica fue realizada en una plantación comercial en Filipinas para controlar la expansión de la raza 4 (Jones, 2000).

2.3.2 CONTROL BIOLÓGICO

La utilización de microorganismos antagonistas o enmiendas orgánicas es una alternativa para mejorar la nutrición y resistencia de las plantas así como disminuir la incidencia de enfermedades (Alabouvette *et al.* 1993). El aporte de estos antagonistas no provoca una reducción de la densidad de los agentes patógenos sino de su actividad, lo que permite disminuir la gravedad de la enfermedad (Jaizme-Vega *et al.* 1997; Smith, *et al.* 1999). El principal interés de este método puede ser el de limitar la propagación del patógeno en la solución nutritiva

después de haber sido sometida a algún tratamiento físico de desinfección, ya que ésta puede que no llegue a ser absoluta (Lorito *et al.* 1993)

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) constituyen parte de la riqueza biológica que se presenta en las opciones de control biológico (Dorado, 1999). Las MA establecen relaciones simbióticas con un gran número de plantas, contribuyendo a una mayor y más eficiente toma de nutrientes, especialmente del fósforo cuando su disponibilidad es deficiente (Jaizme-Vega *et al.* 1997; Smith, *et al.* 1999). Las micorrizas estimulan un aumento de la resistencia o tolerancia a determinados patógenos del suelo en plantas susceptibles a dichos patógenos (Lorito *et al.* 1993; Jaizme-Vega *et al.* 1997; Smith, *et al.* 1999).

Las micorrizas tienen una alta capacidad para incrementar la tolerancia a FOC en las plantas (Jaizme-Vega *et al.* 1997; Smith, *et al.* 1999; Marois, 1998). Smith y colaboradores (1999), trabajaron con plántulas de banano del cultivar Williams (AAA), ellos observaron que se presenta mayor efectividad en la actuación de micorrizas cuando se aplica acompañada con fertilización y que las plantas inoculadas con micorrizas, presentaron un nivel de resistencia cuando estuvieron expuestas a la suspensión de esporas de *Fusarium*.

Los suelos supresivos, en los cuales las poblaciones microbiales suprimen la población del patógeno, fueron descritos, por primera vez en Centroamérica en la década de los 30 (Moore *et al.*, 1995). Los suelos supresivos a *Fusarium*

oxysporum f. sp. *cubense*, son encontrados en diferentes localidades (Stover, 1962; Toussoun, 1975; Chuang, 1988; Marois, 1998). En general estos suelos son reconocidos por el espacio de tiempo que se mantuvo una alta producción de banano, estando presente el patógeno en el suelo.

Estudios de suelos supresivos a enfermedades de *Fusarium* han indicado que el fenómeno es fundamentalmente de naturaleza microbiológica y es el resultado de una compleja interacción entre los patógenos y el todo o de parte de la microflora saprofítica (Marois y Mitchell, 1981; Stover, 1990; Linderman, 1992). El mas consistente resultado de no patogénesis del *Fusarium oxysporum* y *pseudomonas* fluorescentes son el mayor agente para el control biológico (Marois y Mitchell, 1981; Linderman, 1992; Alabouvette *et al.* 1993). La interacción esta siendo efectiva en la reducción de la severidad del ataque de enfermedades causadas por *Fusarium* en diversos cultivos bajo condiciones experimentales (Marois y Mitchell, 1981; Hwang *et al.*, 1982). Así mismo, experimentos recientes a nivel de invernaderos comerciales se vienen desarrollando en donde se esta evaluando por medio de test los requerimientos para la registrar los productos como los biopesticidas destinados a controlar el Mal de Panamá (Alabouvette *et al.* 1993).

Recientemente, Pocasangre *et al.* (1998) y Pocasangre (2000) demostraron que el uso de hongos endofíticos aislados de raíces sanas de plantas de banano pueden ser utilizados como agentes biológicos de control de la enfermedad, los

cuales pueden ser inoculados en vitroplantas del cultivar Gran Enano (AAA) para mejorar la resistencia al ataque de raza 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* . En estos experimentos plantas inoculadas con hongos endofíticos pertenecientes a cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* presentaron una reducción significativa de la severidad de síntomas internos causados por el patógeno en comparación con plantas control. Esta reducción en la severidad de la enfermedad fue explicada por la alta capacidad de colonización de raíces, cormo yseudotallo de las vitroplantas por los hongos endofíticos lo cual evito o redujo que el hongo patogénico parasitara dichos órganos. Estos mismo autores también demostraron que vitroplantas de Gran Enano (AAA) inoculados con hongos endofíticos presentaron mayor peso de raíces y peso foliar que plantas control, lo cual sugiere un mejoramiento biológico del crecimiento y la sanidad de las plantas inducida por los hongos endofíticos.

2.3.3 CULTIVO DE TEJIDOS Y VARIACIÓN SOMACLONAL

Las metodologías de cultivo de tejidos se constituyen en una alternativa tecnológica disponible en la multiplicación de materiales de banana, con buenas características de selección productiva y fitosanitaria. De tal manera, que se disponga de plántulas libres de las principales plagas y enfermedades como picudo negro y rayado, nematodos, moko, marchitez causada por *Fusarium*, y

Sigatoka negra (Berg y Bustamante, 1974; Hwang, 1986; Jones, 2000; Lockhart y Jones 2000a; Lockhart y Jones 2000b; Thomas, *et al.* 2000).

La propagación *in vitro* tiene muchas ventajas, entre las cuales se pueden enumerar, altas proporciones de multiplicación de material sano, uniformidad de plantas y la pequeña cantidad de espacio que se requiere para desarrollar un proceso de cultivo de tejidos y multiplicar gran número de plantas (Banerjee y Delanghe, 1985; Hwang, 1986; Krikorian *et al.* 1993; Jones 2000;). Las técnicas de multiplicación fueron desarrolladas durante las dos últimas décadas y están bien establecidas en la actualidad (Cronauer y Krikorian, 1984; Banerjee y Delanghe, 1985; Hwang, 1986; Vuylsteke, 1989; Israelí *et al.* 1995). Las plántulas micropropagadas son las mejores para garantizar un material libre, de bacterias, hongos, nematodos, y otros patógenos (Jones, 2000).

La variación somaclonal resulta de la variación genética que se produce durante la micropropagación (Sandoval *et al.*, 1991; Israelí, *et al.*, 1995). Las tasas de la variación somaclonal en plantas derivadas del cultivo de tejidos varían entre un 0% a 70 % según el genotipo (Smith, 1988; Vuylsteke, 1991; Israelí, *et al.*, 1995). La inestabilidad genética puede ser un riesgo asociado con la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos para el manejo de germoplasma y su posterior conservación (Hwang, 1987; Daniells y Smith, 1993; Ortiz *et al.* 1998).

La variación somaclonal puede proporcionar otra fuente de variabilidad muy útil, para programas de mejoramiento genético (Smith, 1988; Vuylsteke, 1991; Israe'li *et al.* 1995). La variación somaclonal se presenta después de micropropagar genotipos de una planta madre. La mayoría de las variantes son en su mayor parte de características inferiores al cultivar original del que ellos fueron derivados (Ortiz *et al.* 1998; Smith y Drew, 1990; Vuylsteke, 1996; Sandoval *et al.*, 1991).

La variación somaclonal tuvo hasta ahora una contribución directa y limitada en el aumento genético de *Musa*. Sin embargo, obtener variación somaclonal por la micropropagación puede solo representar una pequeña fracción de la variación que se puede generar por regeneración de cultivos de suspensiones celulares y de protoplastos. La variación somaclonal, puede proporcionar también, un medio para utilizar genotipos que de otra forma son inaccesibles, por ejemplo, la fecundidad de la célula femenina fue aumentada en un variante derivada de una planta estéril, este aumento hizo que esta planta estéril pudiera ser utilizada en sistemas convencionales de cultivo (Vuylsteke, *et al.* 1995; Vuylsteke, 1998; Ortiz *et al.* 1998).

La embriogénesis somática, las suspensiones celulares del cultivo de protoplastos, han sido investigados para evaluar su potencial en la propagación de masiva y como una herramienta en la tecnología del ADN recombinante para obtener la transformación para la obtención de plantas resistentes a enfermedades (Ma, 1988; Novak *et al.* 1989; Escalant y Teisson 1989; Dhed'a *et*

al. 1991; Panis *et al.* 1993; Escalant *et al.* 1993). Sin embargo, la mayor parte de estos procedimientos son todavía laboriosos y el éxito depende del genotipo (Escalant *et al.* 1993).

2.3.4 MEJORAMIENTO GENETICO

Los programas de mejoramiento genético tienen como objetivo desarrollar híbridos de banano resistentes a las principales plagas y enfermedades de importancia económica (Orjeda, 1998). Las variedades mejoradas se esperan tengan la habilidad de prosperar bajo condiciones de crecimiento adversas. De esta forma se espera también, reducir la dependencia de estos cultivos a los agro-químicos y contribuir al desarrollo sostenible de la producción y productividad (ProMusa, 1999; Jones, 2000; Rowe, 1983; Rowe, 1990).

El mejoramiento convencional se inicio en el Caribe en 1922, época en que la raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* estaba atacando al cultivar Gros Michel (AAA) que se exportaba con mayor intensidad (Shepherd, 1968). El programa de mejoramiento genético de banano fue iniciado por la United Fruit Co. en 1958, así mismo comenzó la colecta de germoplasma del Pacífico Occidental y Sureste Asiático (Rowe, 1976). La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) ha continuado los trabajos en banano e inició los trabajos con plátano en 1984 (Rowe, 1990; Rowe y Rosales, 1994). Actualmente este programa es líder mundial en el mejoramiento convencional de banano y plátano (Jones, 2000). Sus

variedades mejoradas están siendo producidas comercialmente en varios países y evaluadas en cerca de 50 países en Asia, Africa, América Latina y Oceanía (Jones, 2000).

Los trabajos de mejoramiento convencional han dado como resultado variedades que presentan características tales como, híbridos con resistencia a enfermedades y de excelente calidad de fruta (Ortiz, 1995; 1994; Rowe y Rosales, 1994; Ortiz y Vuylsteke, 1996). La investigación se ha basado en desarrollar un cultivar de banana de exportación de calidad superior al del subgrupo Cavendish para obtener híbridos resistentes a enfermedades, que podrían ser utilizados por agricultores en países en desarrollo (Jones, 2000a). En este esfuerzo, los diploides mejorados han tenido, rol primordial en el mejoramiento de los bananos. (Jones 2000).

En la FHIA en Honduras, se han desarrollado híbridos tetraploides promisorios, que han sido puestos a disposición de la comunidad internacional, entre los cuales se tienen: FHIA-01, FHIA-02, FHIA-03 y FHIA-21 que están contribuyendo a la seguridad alimentaria de varios países del mundo (Rowe y Rosales, 1994; Rowe y Rosales, 2000). El FHIA-01 y el FHIA-02 se están introduciendo en los mercados de exportación de productos orgánicos. El FHIA 21 (AAAB), con alta resistencia a las Sigatoka negra y amarilla, y además presenta alta resistencia a *Fusarium* (Rowe y Rosales, 1994; Rowe y Rosales, 2000). En general, la principal característica de estos híbridos es su resistencia a varias enfermedades que

actualmente desbordan las plantaciones de Musáceas en todo el mundo: Sigatoka negra, Mal de Panamá y Moko (Rowe y Rosales, 1996; ProMusa, 1999).

Otro mecanismo que se está implantando dentro del mejoramiento genético de *Musa* son los métodos de transferencia de genes para el mejoramiento genético de cultivares silvestres. El éxito relativo de la ingeniería genética en *Musa* se ha logrado para habilitar la transferencia de genes foráneos en células de la planta. Los protocolos para la electroporación de protoplastos derivado del proceso de suspensiones celulares y de la embriogénesis (Dhe'a *et al* 1991; Sagi, *et al.* 1994), el bombardeo de la partícula de células de embriogénesis (Sagi *et al.* 1995) y cultivo de meristemas inoculado con *Agrobacterium* (May *et al.* 1995) están disponibles para las plantas de banano y plátano (Ortiz *et al.* 1998). El sistema puede ser aplicado en cultivos de tejido diferenciado que se puede regenerar rutinariamente en plantas enteras. Además, ha sido aplicado a una serie de cultivares e híbridos de banano y plátano e híbridos (Bosque-Pérez *et al.* 1998).

2.3.5 INDUCCION DE RESISTENCIA

El reino vegetal desarrollan complejos mecanismos para protegerse frente a agresiones ambientales, mecanismos que en muchos casos se basan en la activación de la expresión de ciertos procesos relacionados con genes de defensa. (Salgado y Schwartz, 1994; San Segundo, *et al.* 1999). Adicionalmente, las

plantas pueden adquirir resistencia frente a una amplia gama de agentes patógenos, tales como virus, bacterias y hongos, en respuesta a una determinada infección o a la concentración que se presente del patógeno. (Moore *et al.* 1999).

La Inducción de Resistencia (IR) contra patógenos es una alternativa para reducir el uso indiscriminado de pesticidas. Descubierta a principios del siglo 20 (Ray, 1901; Beauverie, 1901; Alves 1993, Dantas *et al.* 1993), la inducción de resistencia está definida como la resistencia intensificada o fortalecida en una planta con respecto a patógenos como resultado de un tratamiento previo con un patógeno, un patógeno atenuado o un producto químico que, como tal no es un pesticida. La expresión de la resistencia inducida puede ser local o sistémica (Alves 1993, Dantas *et al.* 1993). Es localizada cuando la respuesta se da en el sitio donde se aplica el tratamiento inductor y sistémica cuando la respuesta es efectiva en todas o en algunas partes de las plantas, diferentes al sitio de inducción. (Deverall y Dan, 1995; Riveros y Leopivre, 1998).

Kuc (1993), demostró como funcionan las moléculas activadoras tanto en el invernadero como en campo con enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus. Su investigación hizo despertar un gran interés de parte las compañías transnacionales privadas, las cuales iniciaron la obtención y evaluación de moléculas activadoras abióticas sintéticas, que catalogaron como excelentes candidatas para la inducción de resistencia (Riveros, 2001). En la actualidad se han incorporado algunas de estas moléculas activadoras o "elicitores" en programas de agricultura y horticultura a escala comercial (Kuc, 2001).

Los elicitores son moléculas activadoras capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en la planta, en ausencia del patógeno (Albersheim y Valent, 1978; Keen *et al*, 1972). Esta definición, actualmente se ha generalizado y aplicado a cualquier molécula química que pueda estimular mecanismos de defensa o que estén asociados con la respuesta de defensa de las plantas (Riveros, 2001). Así mismo, es importante resaltar, que en una relación planta-patógeno hay que hacer la distinción entre moléculas activadoras de origen vegetal "elicitador endógeno" y de origen parasitario o por algún agente físico externo "elicitador exógeno" (Riveros, 2001).

Existen mecanismos o reacciones de defensa en las plantas que están asociados con la resistencia. Algunos de estos mecanismos como: la hipótesis gen-por-gen, descrita por Flor (1971), el cual, define la esencia de lo que sería la resistencia vertical monogénica u oligogénica, donde por cada gen que confiere resistencia en la planta le corresponde un gen en el patógeno que le confiere virulencia o viceversa. El otro mecanismo fue descrito por Keen (1975) el cual realizó, una serie de investigaciones que le permitió plantear la hipótesis de "elicitador específico-receptor específico". En esta hipótesis, entre más rápida y eficiente sea la fase de expresión, igual de rápida será la resistencia o tolerancia del hospedante.

Las reacciones de las plantas se manifiestan de dos maneras: reacciones pasivas y reacciones activas (Riveros, 2001; Moore *et al*. 1999). Las reacciones pasivas en la pared celular o espacios intercelulares, se encuentran: la lignina, la callosa,

suberina, depósitos de gomas, la cutina, glucósidos, fenólicos, fenoles, quinonas, esteroides, glicoalcaloides, terpenoides y proteínas (tioninas) (Riveros, 2001; Lyon y Newton, 2000). En las respuestas activas, las cuales se presentan después de la infección se puede mencionar: las fitoalexinas, especies activas de oxígeno "AOS", activación del programa de muerte celular, radicales libres, iones de calcio, siliconas y silicatos, polifenoloxidasas, peroxidasas, fenilalanina, amoniaco liasa, polímeros de pared unidos a formas fenólicas, glicoproteínas ricas en glicina o hidroxiprolina, callosa, lignina, lipooxigenasas, fosfolipasas, tioninas, proteínas ricas en leucina, proteínas antimicrobiales, ribonucleasas, proteasas, péptidos y proteínas relacionadas con la patogenicidad (quitinasas y β -1,3-glucanasas, entre otras) (Riveros, 2001).

Otra característica estudiada como respuesta a la infección es la acumulación de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PRs), las cuales se han definido como proteínas que se acumulan en respuesta a la infección y se pueden localizar tanto en los espacios inter como intracelulares, en preferencia se acumulan en las vacuolas (Yun *et al.* 1997). Stakman (1915), estudio el mecanismo denominado reacción hipersensible (RH), el cual, es la reacción de defensa necrótica rápida y localizada acompañada por muerte celular y solo ocurre en plantas resistentes.

La IR se presenta cuando se somete al material vegetal a tratamiento con compuestos químicos naturales o de síntesis. Esta resistencia se manifiesta

primero localmente en la proximidades del punto de necrosis causado por la infección del patógeno, o el contacto con el compuesto químico, y se llama resistencia local adquirida, luego se extiende a las demás zonas de la planta, y se denomina resistencia sistémica adquirida (RSA) o inducción de resistencia sistémica (IRS) (Moore *et al.* 1999).

Investigaciones realizadas utilizando el ácido fusárico como agente de selección arrojaron resultados promisorios en los procesos de desarrollo de técnicas no convencionales respecto a resistencia/tolerancia contra el mal de panamá (Matsumoto *et al.* 1995). Ha sido utilizado el extracto crudo de raza 1 de FOC como agente de selección en ensayos in vitro inoculando el medio de crecimiento con el extracto del patógeno (Matsumoto *et al.* 1999).

Los aislados de especies de *Fusarium* provenientes de tejidos de raíces de tomate fueron estudiados por su actividad de biocontrol al marchitamiento por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza J1 usando el método de inmersión de raíces. Los resultados indican que las plántulas de tomate tratadas con las especies de *Fusarium* presentaron resistencia sistémica al ataque del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza J1 (Yamaguchi *et al.* 1992). Así mismo, Kroon, *et al.* (1991) inocularon plántulas de tomate con suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y posteriormente fueron expuestas al patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Los resultados de estos experimentos demostraron que las plantas tratadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

desarrollaron resistencia inducida contra el ataque del *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Se ha observado estrategias de resistencia de los derivados de los huéspedes mediante la inhibición de la penetración fúngica: una de las primeras barreras que los patógenos encuentran en necrotrofos particulares durante la penetración y subsiguiente colonización es la pared celular (Cervone *et al.* 1989). Los patógenos fúngicos secretan un número de enzimas para degradar los principales polímeros de la pared celular de las plantas. Las principales enzimas utilizadas para este propósito son cutinasas, endopoligacturonasas y pectatelasas. En respuesta las plantas desarrolladas practican un número de estrategias para inhibir la penetración de un patógeno a través de la pared celular (Sági, 2000; Cervone *et al.* 1989)

El refuerzo de la pared celular, este es un proceso complejo que incluye una rápida síntesis de compuestos fenólicos lo que conlleva a la acumulación de ligninas en la pared celular y la síntesis de hidroxiprolina y otras glucoproteínas para reforzar la matriz extracelular. Otra medida de protección es iniciada por la degradación de las paredes celulares (Sági, 2000). Los componentes de las paredes celulares tales como, azúcares oligómeros que son liberados por enzimas fúngicas peptinolíticas, pueden servir para activar las reacciones de defensa de las plantas, por lo tanto es posible que la expresión de una enzima peptinolítica pueda resultar en una planta transgénica teniendo un estatus de defensa activado

(Jones 2000; Cervone *et al.* 1989). Otros trabajos reportaron que cuando el gen pectate-liasa de la bacteria *Erwinia carotovora* se expresaba en papas, las plantas transgénicas eran resistentes a infecciones causadas por esta bacteria. Sin embargo, esta estrategia no ha sido probada contra los patógenos fúngicos necrotróficos (Jones, 2000; Sagi, 2000).

Las plantas también sintetizan proteínas que inhiben enzimas fúngicas que degradan la pared celular homogalacturonanas a pequeñas uronidas monoméricas. Este inhibidor es la proteína inhibidora poligalacturonasa (PGIP), que es específica a endopoligalacturonasa fúngica y es secretada en la matriz extracelular. Se cree, que las PGIP solo inhiben levemente a las poligalacturonasas y esto conlleva a la elaboración de productos oligoméricos más duraderos, que son lo suficientemente grandes para actuar en respuestas de defensa de las plantas (Cervone *et al.* 1989; Jones 2000).

Investigadores de la transnacional de Zeneca desarrollan la resistencia a Sigatoka Negra y están modificando las características de maduración del plátano. El éxito de estas experimentaciones disminuirá la aplicación de fungicida y mejorará la calidad de la fruta y su aceptación en los mercados (NCGR, 1998).

3. MATERIALES Y METODOS

La investigación se dividió en dos etapas, de las cuales la primera se realizó en dos fases. En la primera fase de la etapa 1, se evaluó el efecto del extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), en las microsecciones de las tres variedades de banano; en la segunda fase, el efecto del extracto crudo de FOC sobre el crecimiento de plántulas regeneradas a partir de las microsecciones. En la segunda etapa, se evaluó la resistencia de plantas preseleccionadas *in vitro* en función del efecto de los aislados de FOC bajo condiciones de invernadero. Además, se realizaron análisis de metabolitos secundarios contenidos en los extractos crudos de los dos aislados del hongo.

3.1 UBICACIÓN GEOGRAFICA

La investigación se realizó en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza – CATIE-, ubicado en el Cantón Turrialba, Costa Rica a 602 m.s.n.m. con 9° 55'21" latitud Norte y 83° 39' 40" longitud Oeste, 2065 mm de precipitación anual, temperatura promedio de 21,7 ° C, 87 % de Humedad Relativa y una Radiación solar promedio mensual de 17 kJ. M⁻² día⁻¹ (Ruiz, 1995).

3.2 AISLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC)

Los aislados de FOC fueron suministrados por el Dr. Randy Ploetz de la Universidad de Florida, USA. Ambos aislados pertenecen al grupo vegetativo de compatibilidad 0120 correspondiente a la raza 1 de FOC. Los aislados fueron colectados de plantas enfermas del cultivar susceptible Gros Michel (AAA) en Costa Rica por el Dr. Harry Stover. Estos aislados se han mantenido en medio PDA a -4° C. Estos cultivos madres fueron usados como inóculo inicial para la multiplicación del hongo, que fue subcultivado cada 7 días en medio PDA para obtener cultivos esporulados de FOC (Fig. 2).

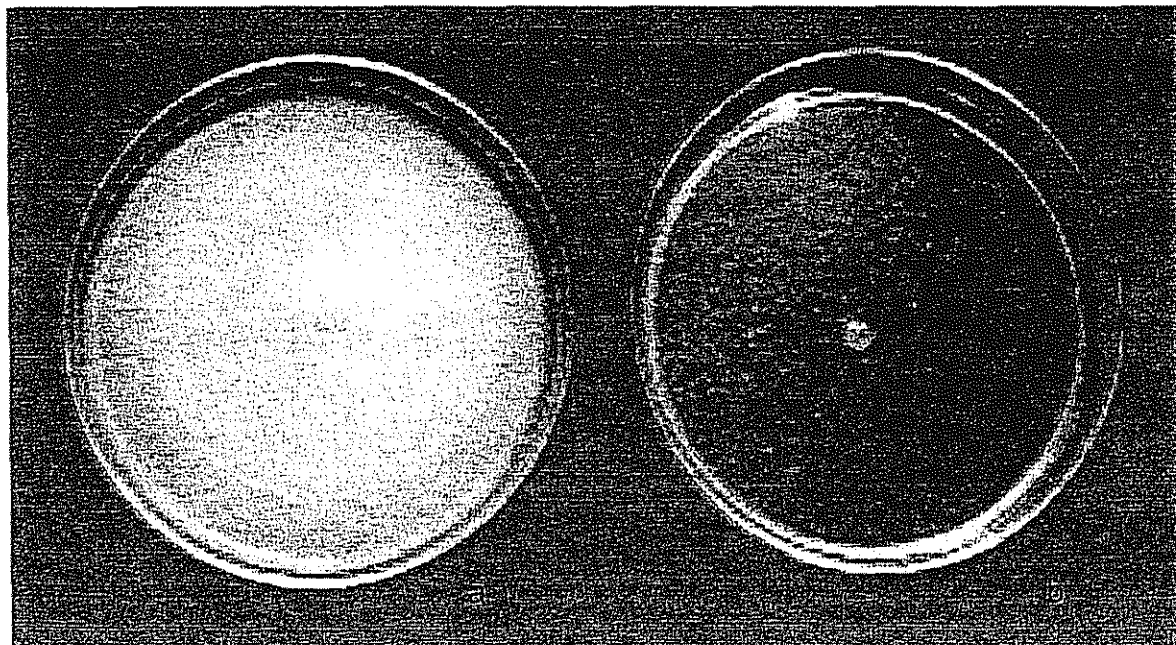


Fig. 2. Crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) en medio PDA.

a. Hongo completamente esporulado; b. Inóculo inicial del hongo.

3.3 MATERIAL VEGETAL

3.3.1 CLONES SELLECCIONADOS

El grupo inicial de vitroplantas fue suministrado por el Centro Internacional de Tránsito de Musaceas de la Red Internacional para el Mejoramiento de Banano y Plátano (INIBAP) localizado en la Universidad Católica de Leuven, Bélgica. Posteriormente los cultivos se subcultivaron cada 4 semanas en medio Murashige y Skoog (1962). Los cultivares de banano utilizados se describen a continuación:

- Gros Michel (AAA) susceptible a Raza 1 de FOC
- FHIA 03 (AABB) moderadamente resistente a Raza 2 de FOC
- Gran Enano (AAA) resistente a Raza 1 y 2 de FOC

3.3.2 PRODUCCION DE MICROSECCIONES

Las microsecciones se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Okole y Schulz (1997). Vitroplantas en estado de crecimiento II se seleccionaron y se realizaron cortes transversales del microcormo de un espesor de 1 a 2 mm. Las microsecciones se colocaron en platos de Petri conteniendo 25 ml de medio de cultivo de multiplicación Murashige y Skoog (1962) enriquecido con hormonas de

crecimiento. Los brotes resultantes de las microsecciones se transfirieron a tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo MS libre de hormonas para favorecer la generación de plantas completas (Wong, 1986; Matsumoto y Yamaguchi, 1989; Okole y Schulz, 1997).

3.4 PREPARACION DEL EXTRACTO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Cultivos esporulados de FOC mantenidos en PDA durante 7 días de crecimiento fueron usados como fuente de inóculo. Bajo condiciones asépticas se extrajeron discos de agar de 0,5 cm de diámetro conteniendo micelio, microconidios y macroconidios de FOC. Los discos de agar se inocularon en un Erlenmeyer conteniendo 100 ml de medio líquido de Czapek Dox (Anexo, 3) y se colocaron en agitación permanente a 95 rpm. Después de dos semanas de cultivo la solución se tamizó en un filtro de 0,2 μm para la obtención estéril del extracto crudo de FOC, (Fig. 3).

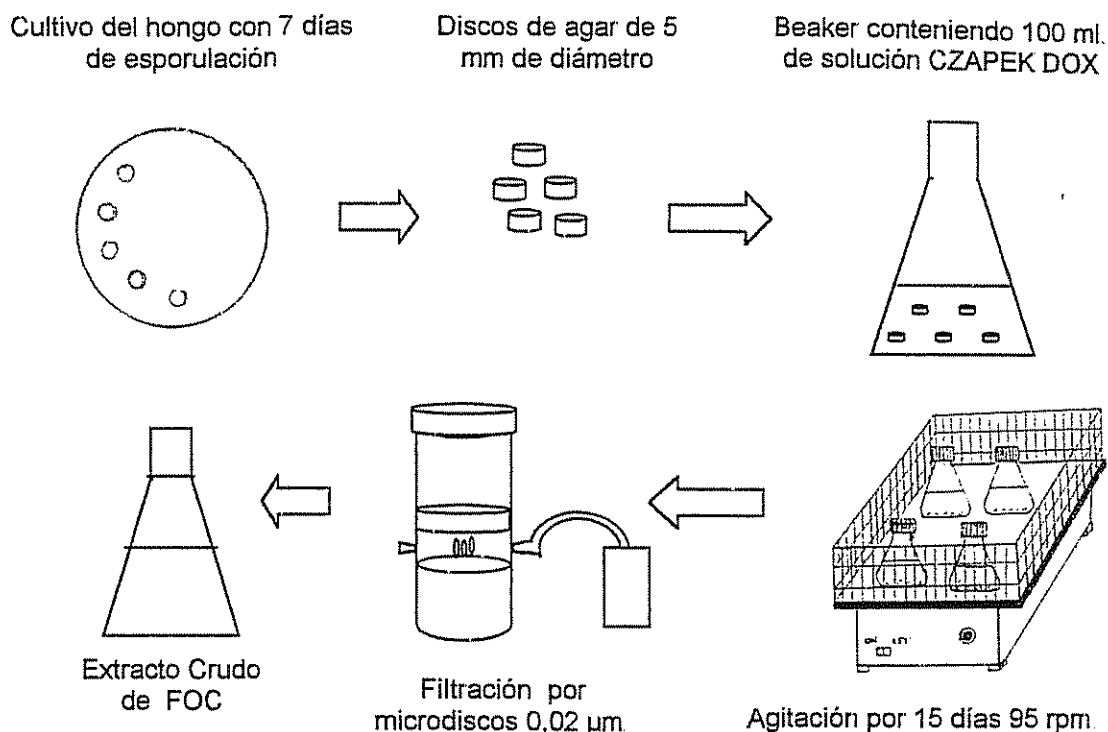


Fig. 3. Protocolo para la obtención del extracto crudo de FOC, en medio líquido CZAPEK DOX.

3.4.1 CONCENTRACION DE LOS TRATAMIENTOS

Los tratamientos evaluados a nivel *in vitro* consistieron en diferentes concentraciones de extracto crudo de FOC que se aplicaron en las microsecciones de banano. Las concentraciones evaluadas para ambos aislados de FOC fueron:

C1 : 100 % de extracto crudo de FOC

C2: 80 % de extracto crudo de FOC

C3: 60 % de extracto crudo de FOC

C4: 40 % de extracto crudo de FOC

C5: 20 % de extracto crudo de FOC

C6: 0 % de extracto crudo de FOC

3.5 ETAPA 1 DE LABORATORIO

3.5.1 FASE I EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE FOC SOBRE MICROSECCIONES DE BANANO

Se tomaron plántulas de banano de cada una de las variedades seleccionadas para la experimentación y se hizo los cortes de las microsecciones de corno descritas en sección 3.3.2. La inoculación de las microsecciones se realizó con alícuotas de 10 μ l de extracto crudo de FOC, depositados en la parte superior de la microsección y colocadas en cápsulas de Petri con medio MS. El control se realizó empleando, microsecciones inoculadas con agua bidestilada estéril. Las microsecciones tratadas en el plato de Petri fueron colocadas aleatoriamente en cámaras de crecimiento, se dejaron crecer por una semana bajo la presión de la sustancia de selección. Los brotes provenientes de las microsecciones que resistieron el efecto del extracto crudo de raza 1 de FOC, se seleccionaron y transfirieron a un medio MS de regeneración para la obtención de una planta completa (Fig. 4).

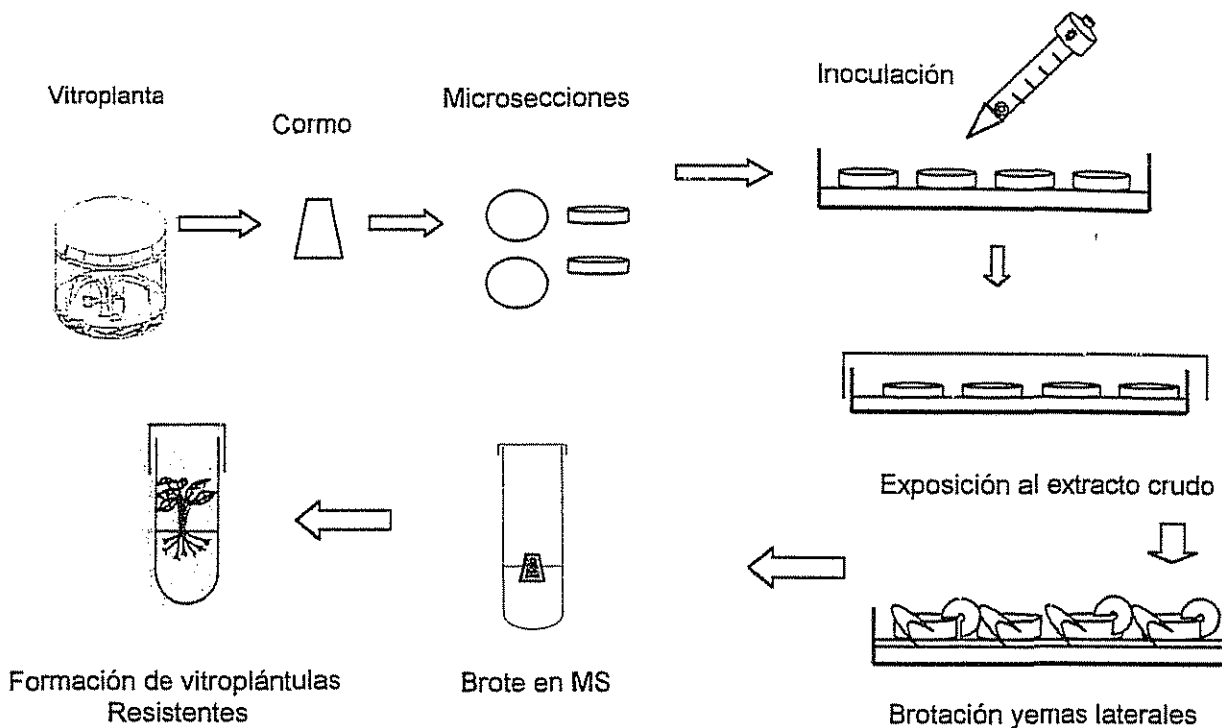


Fig. 4 Protocolo de inoculación de microsecciones y selección de brotes resistentes al extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (FOC).

3.5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Etapa 1, Fase I de la investigación se utilizó un Diseño Completamente al Azar, con un arreglo factorial 2x3x6 con 6 repeticiones para un total de 216 unidades experimentales. En la Fase II de esta Etapa 1 se aplica el mismo diseño con arreglo factorial 2x3x6 con 4 repeticiones para un total de 144 unidades experimentales.

Número de aislados = 2 (A1, A2)

Número de cultivares o líneas = 3 (L1, L2, L3)

Número de concentraciones = 6 (C1, C2, C3, C4, C5, C6)

Número de repeticiones = 6 Fase I

Numero de repeticiones = 4 en Fase II

3.5.3. MODELO MATEMÁTICO

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + A_j + C_k + L_iA_j + L_iC_k + A_jC_k + L_iA_jC_k + E_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijk} : cualquier variable de respuesta

μ : Media General del experimento

L_i : Efecto de Cultivar

A_j :Efecto del aislado

C_k : Efecto de la concentración

L_iA_j : Efecto de la interacción Cultivar - Aislado

L_iC_k :Efecto de la interacción Cultivar- Concentración

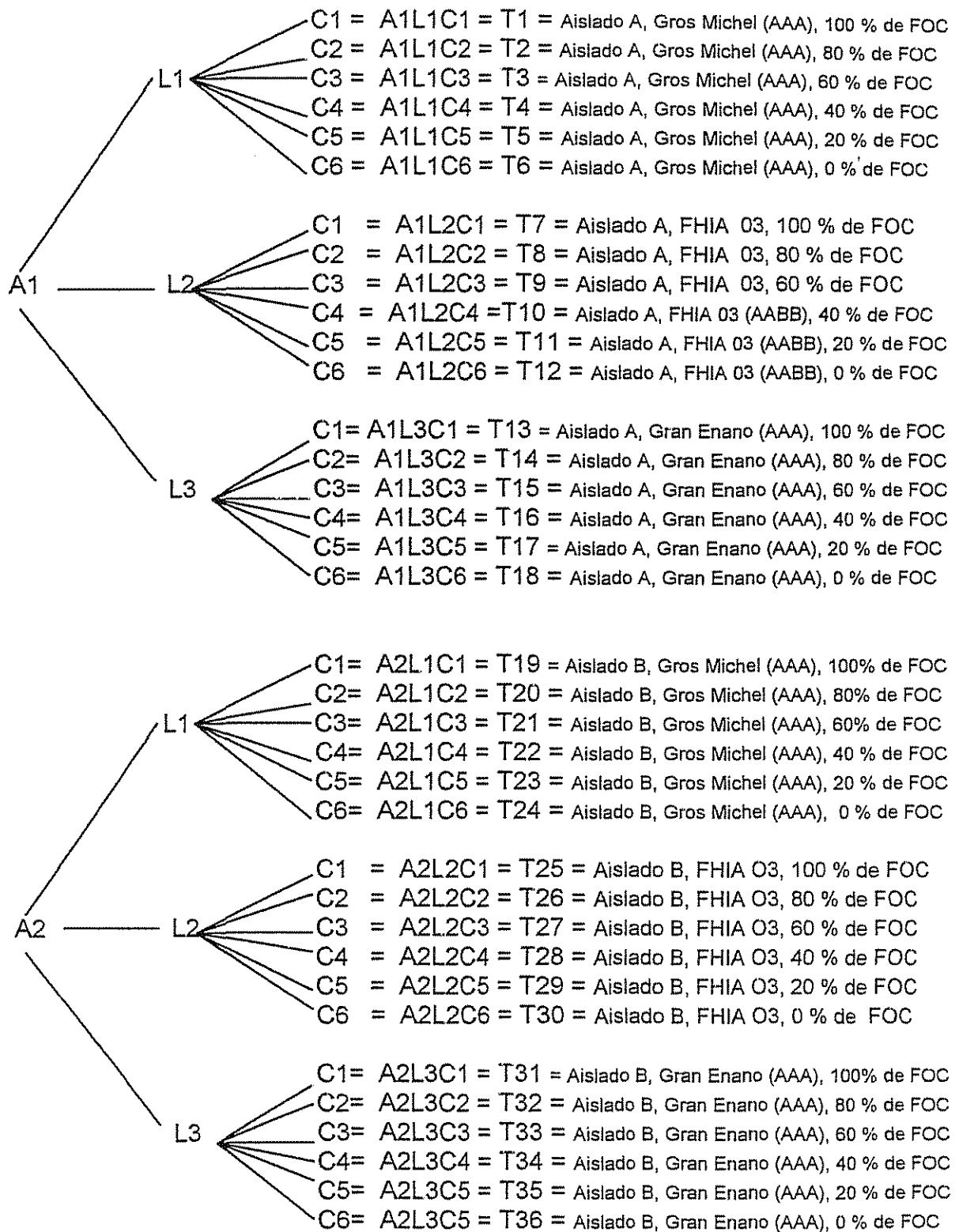
A_jC_k :Efecto de la interacción Aislado – Concentración

$L_iA_jC_k$:Efecto de la interacción L-A-C

E_{ijkl} : Error experimental

3.5.4 DISTRIBUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

En este caso se consideró como unidad experimental cada plato Petri conteniendo 4 microsecciones de corno. Los tratamientos se distribuyeron de acuerdo a las combinaciones siguientes:



En donde:

A1 = Aislado A de FOC

A2 = Aislado B de FOC

L1 = Variedad Gros Michel (AAA)

L2 = Variedad FHIA 03 (AABB)

L3 = Variedad Gran Enano (AAA)

C1 = 100 % de extracto crudo de FOC

C2 = 80 % de extracto crudo de FOC

C3 = 60 % de extracto crudo de FOC

C4 = 40 % de extracto crudo de FOC

C5 = 20 % de extracto crudo de FOC

C6 = 0 % de extracto crudo de FOC

3.6 FASE II EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) SOBRE EL CRECIMIENTO DE VITROPLANTAS.

A plantas regeneradas, provenientes de microsecciones sometidas a las presiones de selección del extracto crudo de FOC, se les eliminó el sistema radical y se les corto transversalmente en la base del corno eliminando el follaje. Estos explantes se transfirieron a medio de crecimiento MS y se inocularon con 100 μ l de las diferentes concentraciones del extracto descritas en el numeral 3.4.1. Los

cormos inoculados se distribuyeron aleatoriamente en las cámaras de crecimiento y se dejaron crecer en tubos de ensayo durante 30 días. Al final de este período se determinó el peso del sistema radical y el peso foliar de las vitroplantas (Fig. 5).

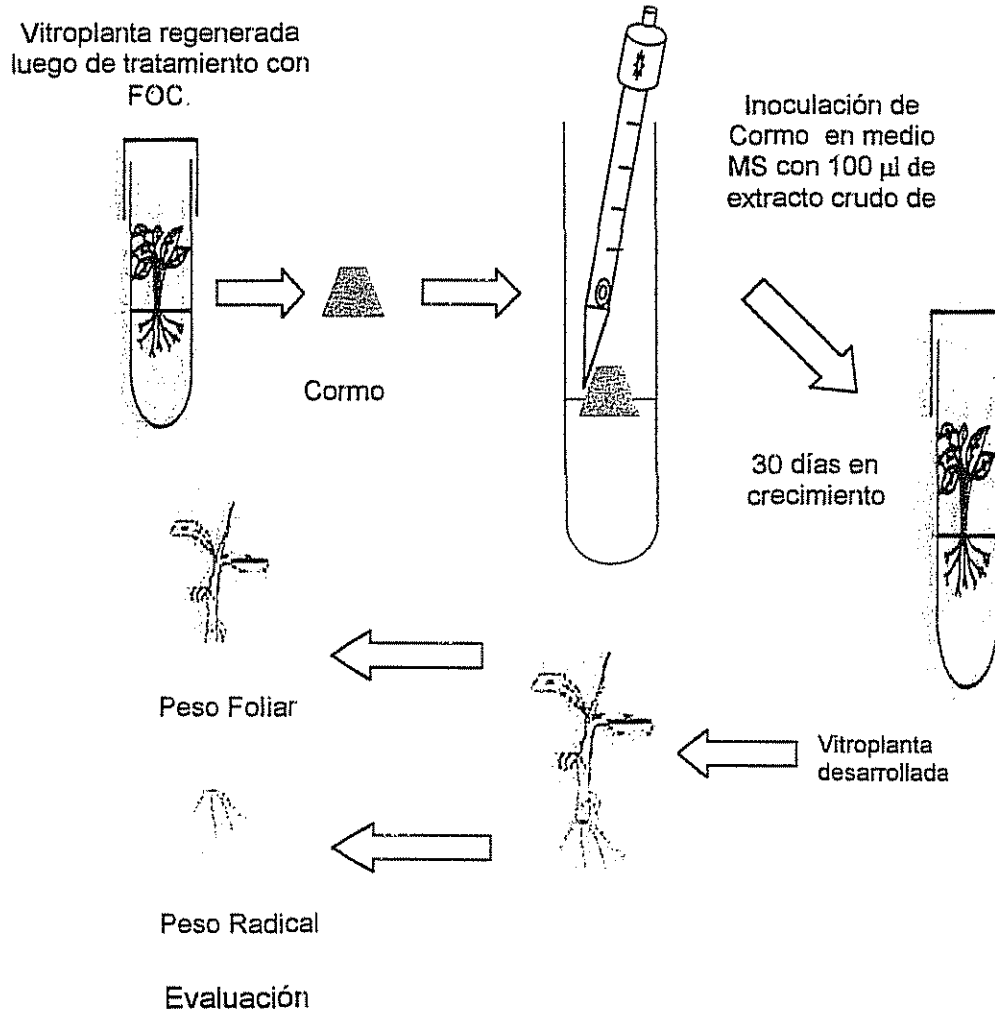


Fig. 5. Protocolo de inoculación y evaluación de vitroplantas sometidas al extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

3.7 ETAPA II EVALUACION DE LINEAS RESISTENTES EN CONDICIONES DE INVERNADERO

3.7.1 OBTENCION DE LA SUSPENSION DE ESPORAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC).

Cultivos esporulados de FOC mantenidos en PDA durante 7 días de crecimiento fueron utilizados como fuente para la elaboración de la suspensión de esporas. Bajo condiciones de total asepsia, se le agregó a cada cultivo esporulado de los aislados A y B, 25 ml de agua bidestilada y esterilizada; se removió con espátula para desprender del medio de cultivo PDA el micelio del hongo. Con pipeta se tomó la cantidad de líquido del cultivo y se filtró todo hasta obtener el extracto del hongo. Esta operación se realizó de igual forma con el cultivo esporulado del aislado B. Después de estas suspensiones se tomó una pequeña cantidad con una pipeta y se colocó en el portaobjetos del Hemacitómetro Placa de Neubauer y se realizó el conteo de la cantidad de esporas de FOC. La suspensión de esporas de ambos aislados. fue ajustada a la concentración de esporas de 1×10^5 cfu/ml de FOC.

3.7.2 MATERIAL VEGETAL: VITROPLANTAS RESISTENTES

Vitroplantas que soportaron el efecto del extracto crudo de FOC, endurecidas durante un mes en condiciones de invernadero fueron seleccionadas y retiradas del sustrato. Cada planta fue sumergida durante 5 minutos en una suspensión de esporas de 1×10^5 cfu/ml de FOC. Posteriormente, se sembraron en macetas conteniendo una mezcla de arena-suelo estéril en partes iguales. Dos semanas después de la primera inoculación se realizó una segunda inoculación con 5 ml de la solución de esporas de 1×10^5 cfu/ml de FOC aplicadas en 3 orificios en el sustrato cercana a la base del rizoma. Con la misma periodicidad, se realizó una tercera inoculación utilizando la misma dosis de suspensión de esporas, como en el caso anterior.

Las plantas inoculadas se dejaron crecer durante tres meses en condiciones de invernadero. Las evaluaciones de la incidencia de la enfermedad y los síntomas externos como amarillamiento y marchitez se midieron mensualmente. A los tres meses, se realizó una evaluación final de la incidencia y severidad interna de la enfermedad, mediante cortes longitudinales del cormo de las vitroplantas. La severidad externa e interna de acuerdo a la escala de severidad de síntomas internos de la enfermedad descritos por Orjeda (1998). Adicionalmente, fueron evaluados parámetros de crecimiento como: peso radical y peso foliar de las plantas.

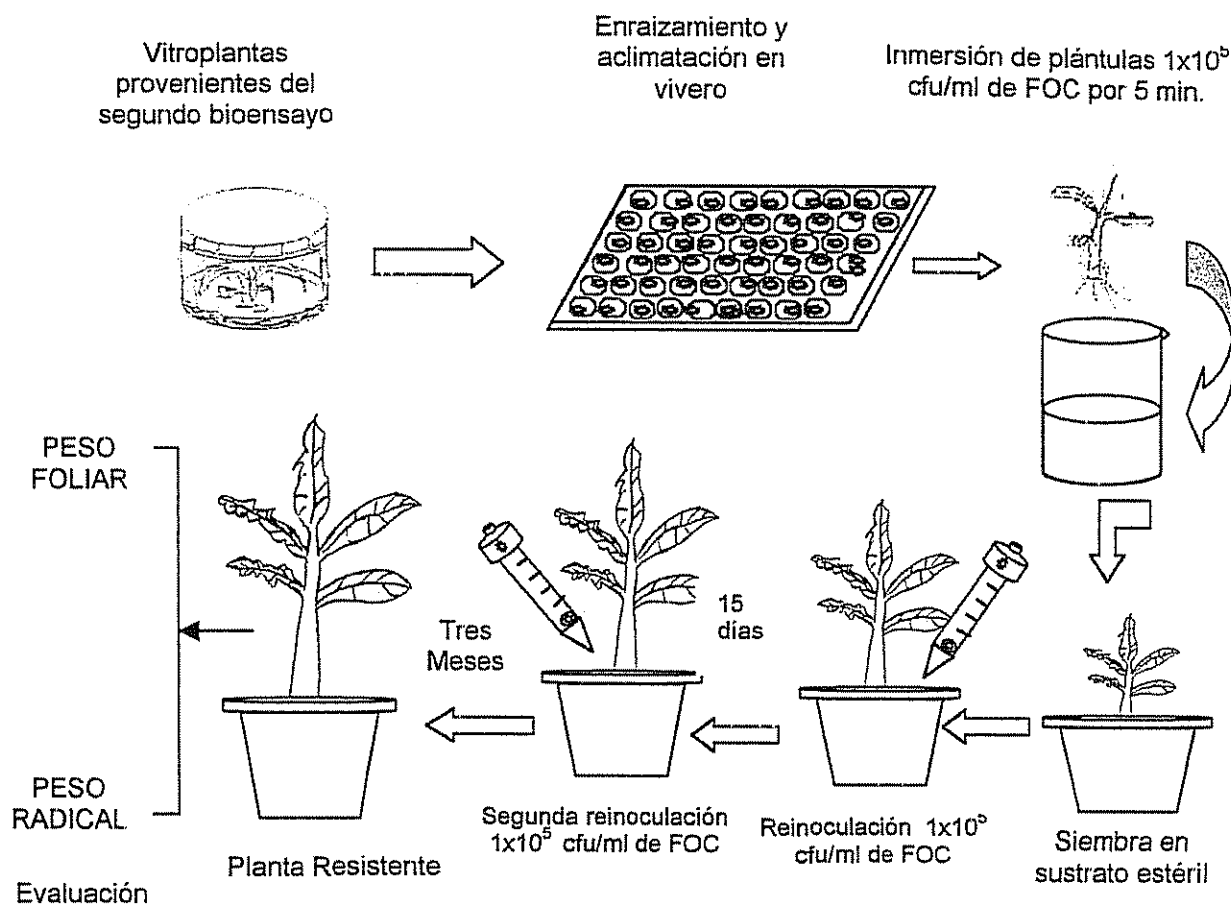


Fig. 6. Protocolo de Inoculación de plántulas provenientes de bioensayo 2 con Suspensión de Esporas de 1×10^5 cfu/ml de FOC.

La incidencia de la enfermedad se evaluó en porcentajes de plantas que presentaron síntomas de la enfermedad. La severidad de los síntomas internos y externos se evaluó de acuerdo a la escala de Orjeda (1998) que se presenta a continuación:

- 0 = Ausencia de Síntomas
- 1 = Amarillamiento y marchitez hojas viejas
- 2 = Amarillamiento y marchitez hojas bajas
- 3 = Amarillamiento y marchitez hojas jóvenes
- 4 = Severo amarillamiento y marchitez

Escala para la evaluación severidad de síntomas internos de FOC(Orjeda, 1998).

- 1: Trazas de decoloración del corno menor al 5 %, no-decoloración en el seudotallo.
- 2: Decoloración hasta el 25 % de corno y trazas en el seudotallo
- 3: Decoloración hasta el 50 % del corno y seudotallo
- 4: Decoloración hasta 75 % del corno y seudotallo
- 5: Decoloración completa del corno y muerte de la planta

3.8.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar, con un arreglo factorial 2x3x5 con 4 repeticiones para un total de 120 unidades experimentales

Número de aislados = 2 (A1, A2)

Número de cultivares o líneas = 3 (L1, L2, L3)

Número de concentraciones = 5 (C3, C4, C5, C6, Testigo Absoluto TA)

Número de repeticiones = 4

3.8.4. MODELO MATEMÁTICO

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + A_j + C_k + L_iA_j + L_iC_k + A_jC_k + L_iA_jC_k + E_{ijkl}$$

Donde: Y_{ijk} : cualquier variable de respuesta

μ : Media General del experimento

L_i : Efecto de Cultivar

A_j : Efecto del aislado

C_k : Efecto de la concentración

L_iA_j : Efecto de la interacción Cultivar - Aislado

L_iC_k : Efecto de la interacción Cultivar- Concentración

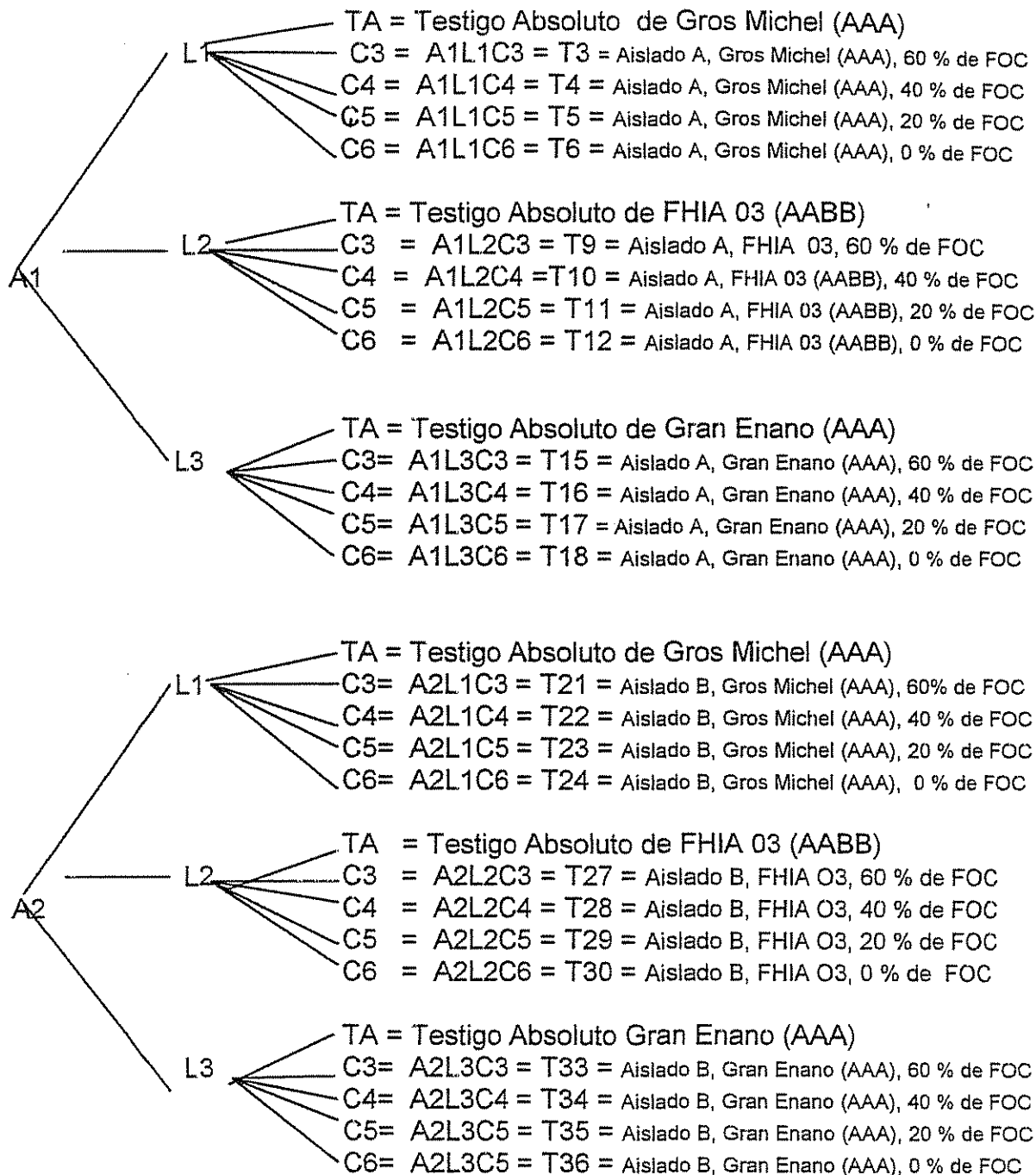
A_jC_k : Efecto de la interacción Aislado – Concentración

$L_iA_jC_k$: Efecto de la interacción L-A-C

E_{ijkl} : Error experimental

3.8.5 DISTRIBUCION DE LOS TRATAMIENTOS ETAPA II

En este último ensayo se eliminaron los tratamientos correspondientes a las concentraciones de 80 % Y 100 % de extracto crudo de FOC, debido a muerte total de las vitroplantas de la variedad Gros Michel (AAA).



3.9 ESTUDIOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE EXTRACTO CRUDO DE FOC

Con interés de obtener una mayor información sobre el extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, se realizó un estudio de metabolitos secundarios en los dos aislados del hongo.

3.9.1 ANALISIS CUALITATIVO DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EXTRACTOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Cultivos esporulados de FOC fueron seleccionados para la obtención del extracto crudo cuyo procedimiento descrito en numeral 3.4. Los extractos crudos de ambos aislados fueron liofilizados en el laboratorio de Nutrición Animal del CATIE y posteriormente fueron enviados al Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Nacional de Costa Rica para realizar los análisis de metabolitos secundarios.

3.9.1.1. PREPARACIÓN MUESTRA

Los extractos crudos de FOC, fueron liofilizados hasta lograr sequedad total, para permitir la conservación de los metabolitos en el extracto. El 60 % del extracto fue restituido con agua destilada y extraído con disolventes orgánicos de polaridad creciente. El orden de extracción fue el siguiente: hexano, cloroformo, acetato de

etilo y residuo acuoso. La finalidad de este fraccionamiento es distribuir los metabolitos secundarios de acuerdo a su solubilidad y para poder realizar la cromatografía de capa fina (CCF) para la detección cualitativa de los metabolitos. El 40 % del extracto seco se restituyó con agua destilada y se realizó análisis de polifenoles por el método de iterbio, taninos y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para ello, los dos aislados se analizaron en HPLC con El cromatógrafo es de series 4 de Perkin Elmer, el cual, cuenta con un bomba cuaternaria con capacidad para hacer gradiente empleando una columna de analítica de fase reversa (C₁₈) y la fase móvil gradiente de 100% agua: HOAC (agua:ácido acético) (97.5:2.5) a 100% metanol en 40 minutos, manteniendo el sistema isocrático por 5 minutos más en el segundo disolvente. El detector empleado fue de luz ultravioleta a una longitud de onda (λ) de 280 nm, valor en el cual, los compuestos aromáticos absorben. El extracto liofilizado pesó en promedio 350mg, de los cuales 200 se redisolvieron para el HPLC, NO se inyectaron los 200mg.

Los Taninos condensados (como antocianidinas) fueron analizados en las muestras empleando el método de *n*-butanol:HCL (95:5 %). Los datos son reportados en absorbancia / ml de extracto acuoso usado. La absorbancia a 545 nm significa que los datos se están reportando como cianidina y a 560 nm como delfinidina, ambas son antocianidinas. A mayor absorbancia, mayor cantidad de taninos.

Las pruebas de alcaloides se realizaron en los extractos acuosos que fueron extraídos con disolventes de diferente polaridad. Los alcaloides fueron detectados en cromatografía de capa fina de sílica gel ²⁵⁴ desarrollada empleando cloroformo: metanol (90:10) y revelados con Dragendorff. Los otros compuestos se revelaron con vainillina - H₂SO₄ concentrado (Domínguez, 1988). Los polifenoles totales se analizaron en los extractos acuosos regenerados empleando el método gravimétrico de Iterbio propuesto por Corry *et. al.* (1985).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE FOC SOBRE MICROSECCIONES

El uso de extractos crudos de especies patogénicas de *Fusarium* han sido exitosamente utilizados como agentes de selección de resistencia a las marchiteces causadas por *Fusarium* en diferentes cultivos. Por ejemplo: en Papa (Behnke, 1980); en Clavel (Buiatti et al. 1985); Alfalfa (Arcioni, *et al.* 1987) y recientemente en banano (Matsumoto *et al.* 1999). Las concentraciones del extracto crudo usadas en los trabajos anteriormente citados han variado dependiendo del cultivo y la metodología de extracción del extracto crudo.

En la presente investigación, inoculaciones de diferentes concentraciones de extracto crudo de FOC sobre microsecciones de tres cultivares de banana, fueron evaluados sobre la respuesta de brotación de las microsecciones 10 días después de la aplicación. Los resultados muestran diferencias altamente significativas en la brotación de la microsecciones en las diferentes concentraciones del extracto crudo del hongo en los cultivares evaluados (Anexo 8; Cuadro 2). Al realizar el análisis de las diferencias entre las medias, de los respectivos tratamientos mediante la prueba de Tukey, se observó que la concentración 1 (100 % extracto crudo de FOC) provocó una disminución drástica de la brotación de las yemas laterales de las microsecciones en el cultivar susceptibles Gros Michel (AAA) (Cuadro 2).

Estos resultados demuestran que a medida que la concentración del extracto crudo de FOC aislado A aumentó la producción de brotes en las microsecciones disminuyó drásticamente en el cultivar susceptible Gros Michel (AAA). Se observó que a una concentración de 100 % de extracto crudo de FOC aislado A, se registró un promedio en de 0.16 brotes por microsección. En contraposición, en ausencia del extracto crudo la brotación de las microsecciones fue de 2.33 brotes (Cuadro 2).

Una disminución mas drástica en la brotación fue registrada cuando las microsecciones fueron sometidas al extracto crudo de FOC aislado B., en donde ningún brote fue observado usando 100% del extracto crudo (Fig. 7), lo cual indica el grado de toxicidad del extracto crudo del hongo en la variedad susceptible Gros Michel (AAA). Resultados similares fueron reportados por Matsumoto *et al* (1999), quienes trabajando con extracto crudo de raza 1 de FOC en el cultivar susceptible Manzano (AAB), encontraron que concentraciones superiores a 15% del extracto crudo eran capaces de causar la muerte del 25.6 % de los brotes laterales a nivel *in vitro*. Los mismos autores demostraron que el uso de extractos crudos del hongo como agentes de selección a bajas concentraciones inducen resistencia de los brotes laterales al ataque del patógeno y que la técnica es de suma utilidad para la selección temprana de plantas resistentes al Mal de Panamá en el cultivar Manzano (AAB). De igual manera, el uso de extractos crudos de *Mycosphaerella fijiensis* también han sido reportados por Okole y Schulz (1997), como sustancias inductoras de resistencia a la Sigatoka

negra. Los autores de este trabajo encontraron que el uso de extractos crudos del hongo a bajas concentraciones aplicados sobre microsecciones de banano pueden ser usados como agentes de inducción de resistencia para la selección temprana de vitroplantas resistentes al patógeno.

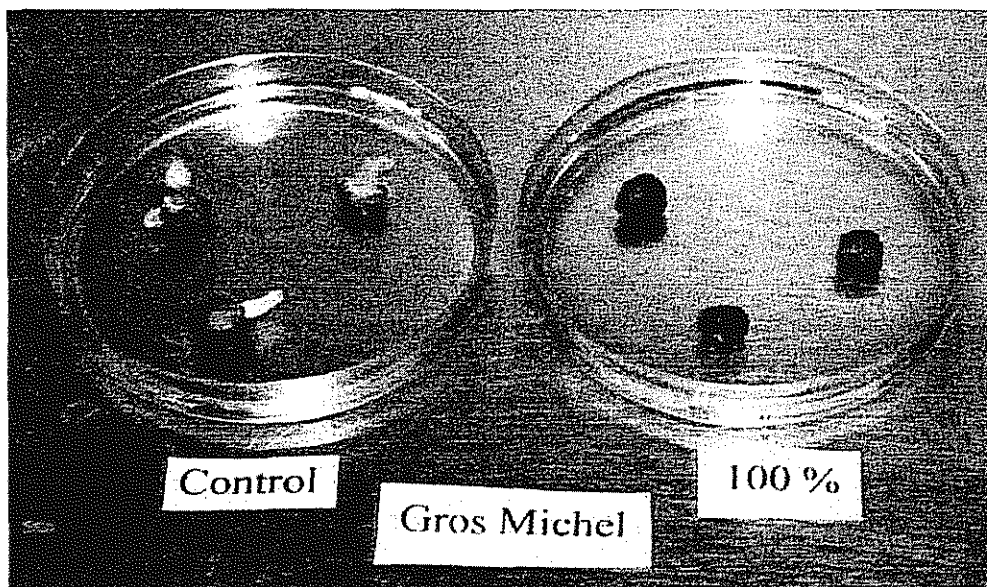


Fig. 7. Efecto del extracto crudo de FOC sobre la brotación de microsecciones de la variedad Gros Michel (AAA).

Cuadro No 2. Efecto del Extracto crudo de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* FOC sobre la emisión de brotes laterales en microsecciones de tres variedades de banano

FOC A	PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE BROTES POR CULTIVAR		
	GROS MICHEL (AAA)	FHIA 03 (AABB)	GRAN ENANO (AAA)
CONCENTRACIÓN*			
0 %	2,33 a	2,16 a	2,66 a
20 %	1,66 ab	1,83 a	2,66 a
40 %	1,16 bc	1,66 ab	2,16 a
60 %	0,83 cd	1,50 ab	2,33 a
80 %	0,33 d	1,00 bc	2,50 a
100 %	0,16 e	0,83 dc	2,33 a

FOC B	PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE BROTES POR CULTIVAR		
	GROS MICHEL (AAA)	FHIA 03 (AABB)	GRAN ENANO (AAA)
CONCENTRACIÓN*			
0 %	2,00 a	2,16 a	2,66 a
20 %	1,50 ab	1,83 a	2,33 a
40 %	1,00 bc	1,00 bc	2,66 a
60 %	0,83 cd	1,66 ab	2,33 a
80 %	1,16 bc	1,50 ab	2,33 a
100 %	0,00 e	0,83 dc	2,50 a

C* = concentraciones (promedio de 6 repeticiones). Solo en los cultivares Gros Michel (AAA) y FHIA 03 (AABB). En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), aplicando prueba de Tukey.

En el híbrido FHIA 03 (AABB), ambos aislados de FOC de 80 % y 100 % tuvieron un efecto detrimental sobre la brotación de las microsecciones (Cuadro 2); también se observó un efecto tóxico de los tratamientos a medida que la

concentración del extracto crudo aumenta, disminuye la brotación de las microsecciones. Sin embargo, su efecto es menos drástico que en el cultivar Gros Michel (AAA).

En el cultivar Gran Enano (AAA), las microsecciones sometidas a las concentraciones de los aislados A y B de FOC, no se observó ningún efecto tóxico del extracto crudo de FOC sobre la brotación de las microsecciones (Anexo 8, Cuadro 2). Estos resultados se explican debido a que el cultivar Gran Enano (AAA) es resistente a Raza 1 y 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Stover, 1986; Ploetz y Pegg, 1994). Resultados similares fueron encontrados por Pocasangre (2000), quien realizó estudios de patogenicidad en condiciones in vitro de raza 1, 2 y 4 de FOC, en cultivares diferenciales Gros Michel (AAA), Bluggoe (ABB) y Gran Enano (AAA) para cada raza de FOC encontrando que una incidencia de la enfermedad de 100 % en cultivares diferenciales cuando eran tratadas con la raza específica del hongo.

4.2 EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) SOBRE EL CRECIMIENTO DE VITROPLANTAS.

Vitroplantas en estadio II que se desarrollaron a partir de los brotes provenientes de las microsecciones del primer bioensayo, se les eliminó el sistema radical y se corto transversalmente en la base del corno eliminando el follaje. Estos explantes

se transfirieron a medio de crecimiento MS y se inocularon con 100 μ l de las concentraciones del extracto de acuerdo a la concentración mencionadas en el numeral 3.4.1. Estos explantes se colocaron en la cámara de crecimiento por espacio de 30 días. Al final de este período se determinó los parámetros de crecimiento correspondientes al peso radical y peso foliar de las plantas.

Los resultados de este bioensayo demuestran que a medida que la concentración del extracto crudo de aislado A de FOC aumentó, el crecimiento de los explantes representado por el peso radical y peso del follaje disminuyó drásticamente en el cultivar susceptible Gros Michel (AAA) (Anexos 9 y 10, Cuadro 3). Además concentraciones de 80 y 100 % de extracto crudo de FOC aislado A fueron perjudiciales en el crecimiento foliar y radical de las vitroplantas, lo cual denota la alta toxicidad del extracto crudo del hongo. Consecuentemente la posibilidad del uso de altas concentraciones del extracto crudo del hongo como agentes de selección de vitroplantas resistentes a FOC es muy poco probable, debido a su alta toxicidad. Estos resultados indican que la búsqueda de concentraciones óptimas para utilizarse como agentes de selección de resistencia a la enfermedad, debe hacerse en concentraciones inferiores al 80% del extracto crudo de FOC. Resultados similares fueron encontrados por Mendes, *et al*, (1993), quienes estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de ácido fusárico del extracto crudo de FOC en el desarrollo *in vitro* de plántulas de banano del cultivar Pisang Mas (AA), susceptible al Mal de Panamá y el cultivar Nanicao (AAA), resistente a la enfermedad. Los resultados de esta investigación

indican que concentraciones de 6% de ácido Fusárico del extracto crudo de FOC reducen el crecimiento foliar de las vitroplantas hasta en 74% en la variedad susceptible Pisang Mas (AA) en comparación con las vitroplantas control en las que no se aplicó el extracto crudo. Los mismos autores también señalan que las concentraciones de 3 a 4.5% de ácido fusárico del extracto crudo de FOC fueron optimas para seleccionar vitroplantas resistentes al Mal de Panama en condiciones *in vitro*.

En el caso del híbrido FHIA 03 (AABB), se observó el efecto tóxico del extracto crudo ambos aislados de FOC, en el crecimiento de las vitroplantas a medida que la concentración del extracto crudo aumentó, disminuyó el peso radical y foliar de las vitroplantas. Concentraciones de 80 y 100 % fueron detrimentales en el crecimiento de las vitroplantas. Además tanto el aislados A y B de FOC tuvieron un efecto tóxico sobre el desarrollo de las vitroplántulas. Sin embargo su efecto es menos detrimental que en el cultivar susceptible Gros Michel (AAA) (Cuadro 3).

En el cultivar Gran Enano (AAA), no se detectó ningún efecto toxico del extracto crudo de ambos aislados del hongo por lo que no se registraron diferencias significativas en el crecimiento del peso radical y peso de follaje de las vitroplantas (Cuadro 3). Estos resultados concuerdan con la resistencia encontrada en el bioensayo de microsecciones de la presente investigación, donde tampoco hubo efecto toxico del extracto crudo de ambos aislados FOC sobre los brotación de las

microsecciones. Estos resultados se explican debido a que el cultivar Gran Enano (AAA) es resistente a Raza 1 y 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Cuadro 3. Efecto del extracto crudo aislados A y B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* FOC sobre el crecimiento de vitroplantas

FOC A	GROS MICHEL (AAA)		FH IA 03 (AABB)		GRAN ENANO (AAA)	
	PR	PF	PR	PF	PR	PF
0 %	2,120 a	4,708 a	2,068 a	4,055 a	1,060 b	4,650 a
20 %	1,860 a	3,965 a	1,575 a	3,893 ab	0,978 c	4,320 a
40 %	1,983 a	3,408 a	1,508 a	4,775 a	1,000 b	4,870 a
60 %	0,845 cd	0,718 d	1,485 a	3,415 bc	0,958 c	4,340 a
80 %	0,488 d	2,518 c	1,450 ab	3,350 bc	0,955 c	4,200 a
100 %	0,000 d	0,000 d	1,210 bc	2,805 c	1,028 b	4,280 a

FOC B	GROS MICHEL (AAA)		FH IA 03 (AABB)		GRAN ENANO (AAA)	
	PR	PF	PR	PF	PR	PF
0 %	1,915 a	3,828 ab	2,068 a	3,863 ab	1,083 a	4,415 a
20 %	1,610 a	3,195 b	1,575 ab	3,718 ab	1,140 a	4,090 a
40 %	1,528 ab	2,760 c	1,508 ab	3,310 ab	0,983 b	4,523 a
60 %	1,060 c	3,100 b	1,485 b	3,135 b	0,995 b	4,018 a
80 %	0,570 d	2,543 bc	1,450 b	2,975 bc	1,020 ab	4,228 a
100 %	0,000 d	0,000 d	1,210 c	2,865 bc	0,900 b	3,968 a

C* = concentraciones (promedio de 4 repeticiones). Solo en los cultivares Gros Michel (AAA) y FHIA 03 (AABB) En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), aplicando prueba de Tukey.

PR = Peso de raíces; PF = Peso de follaje.

4.3. ETAPA II ENSAYO CON LINEAS RESISTENTES EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

Los resultados evidencian que existieron diferencias significativas en la incidencia y severidad de la enfermedad en el cultivar susceptible Gros Michel (AAA) y en FHIA 03 (AABB) en las tres evaluaciones registradas del ensayo. Síntomas externos de la enfermedad, medidos por el amarillamiento y marchitez fueron observados un mes después de la inoculación de FOC (Fig. 8 y 9). Asimismo, los resultados demuestran que tanto la incidencia como la severidad de los síntomas externos se incrementaron en el 2 y 3 meses después de la inoculación con FOC y el testigo absoluto (TA) constituido por plantas que no fueron inoculadas con FOC no presentaron ningún síntoma de la enfermedad en los tres cultivares (Anexo 6)

La incidencia de la enfermedad en el cultivar susceptible Gros Michel (AAA) fue de 100% (Fig. 10), en plantas que no fueron preseleccionadas con el extracto crudo de FOC en condiciones *in vitro*. Por el contrario, solamente 25% de incidencia de la enfermedad fue encontrada en plantas que fueron preseleccionadas con el extracto crudo del hongo a 40 y 60 % (Fig. 10) (Anexo 6). Esta reducción de 75% de la incidencia de la enfermedad demuestra que concentraciones 40 y 60% de extracto crudo de FOC son capaces de inducir resistencia al efecto del patógeno en condiciones de invernadero y que la resistencia expresada a nivel *in vitro* se mantiene en condiciones drásticas de triple inoculación del hongo en condiciones de invernadero. Así mismo, la

severidad de los síntomas externos, demuestran que hubo una reducción significativa de la severidad de la enfermedad entre las plantas preseleccionadas con concentraciones de 40 y 60% del extracto crudo que plantas que no fueron preseleccionadas (Anexo 6). Resultados similares fueron encontrados por Matsumoto et al. (1999), quienes evaluaron el efecto de extracto crudo de FOC, raza 1, en el cultivar manzano (AAB) y encontraron que plantas que no fueron preseleccionadas con extracto crudo de FOC presentaron una incidencia de 83 % y en plantas preseleccionadas la incidencia de la enfermedad fue de 67%.

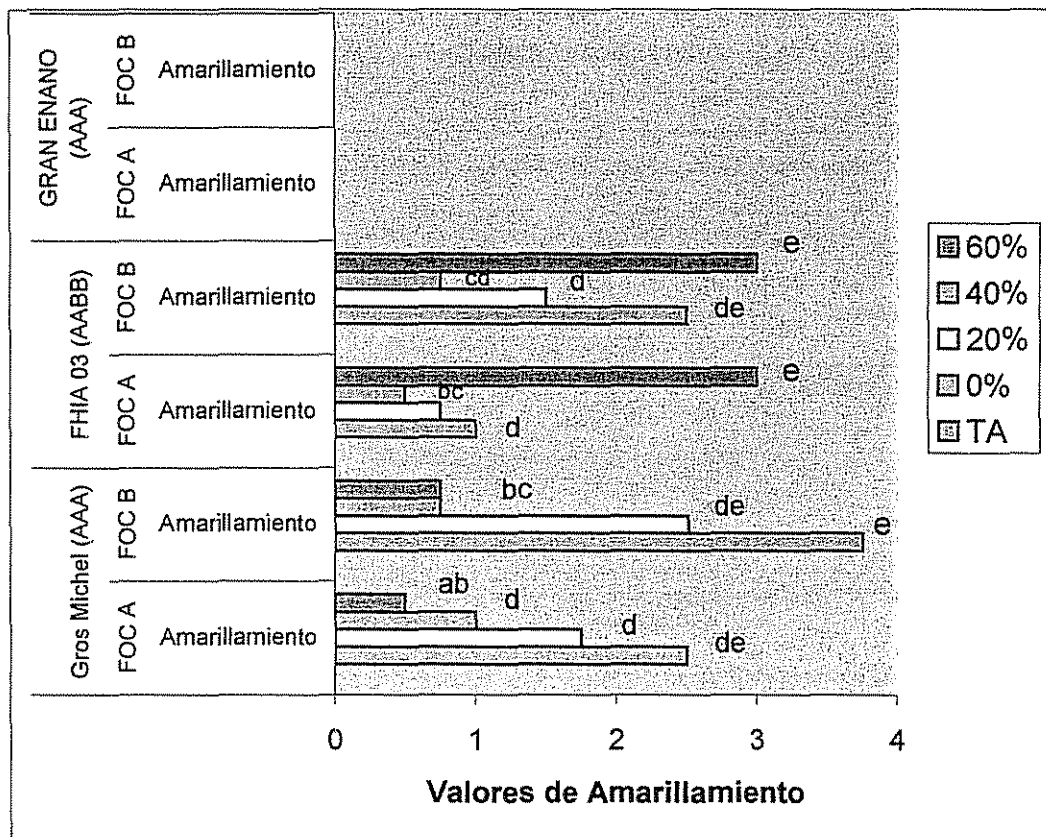


Fig. 8 Efecto del *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* sobre el amarillamiento de tres cultivares de banano

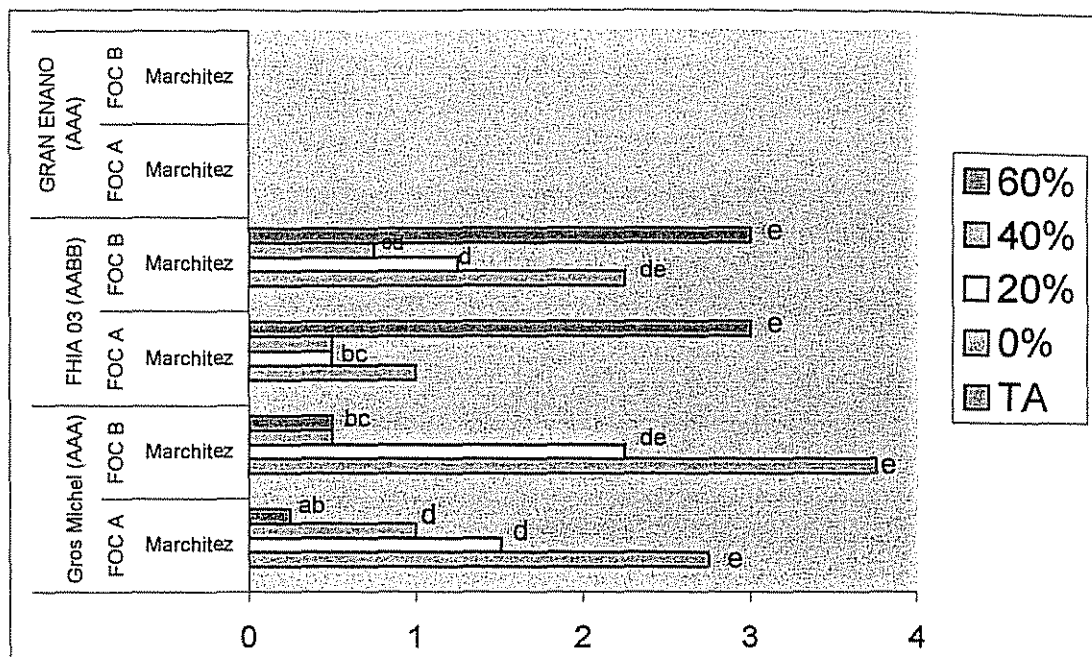


Fig. 9 Efecto del *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* sobre la marchitez de tres cultivares de banano

Con la excepción del aislado A de FOC en el híbrido FHIA 03 (AABB) plantas preseleccionadas con 60% de extracto crudo del hongo presentaron grados de incidencias de la enfermedad superiores que plantas no preseleccionadas con el extracto crudo del hongo (Anexo 6). Estos resultados podrían ser explicados debido a que la concentración de 60% del extracto crudo tuvo un efecto tóxico latente que no pudo ser detectado en condiciones *in vitro* y que solamente se expresó en condiciones de invernadero. Sikora y Schuster (1999), postulan que técnicas de selección de resistencia *in vitro* donde se involucra la acción de metabolitos secundarios como agentes de selección en algunos casos no pueden ser reproducibles en condiciones *in vivo* en experimentos en invernadero y el campo.

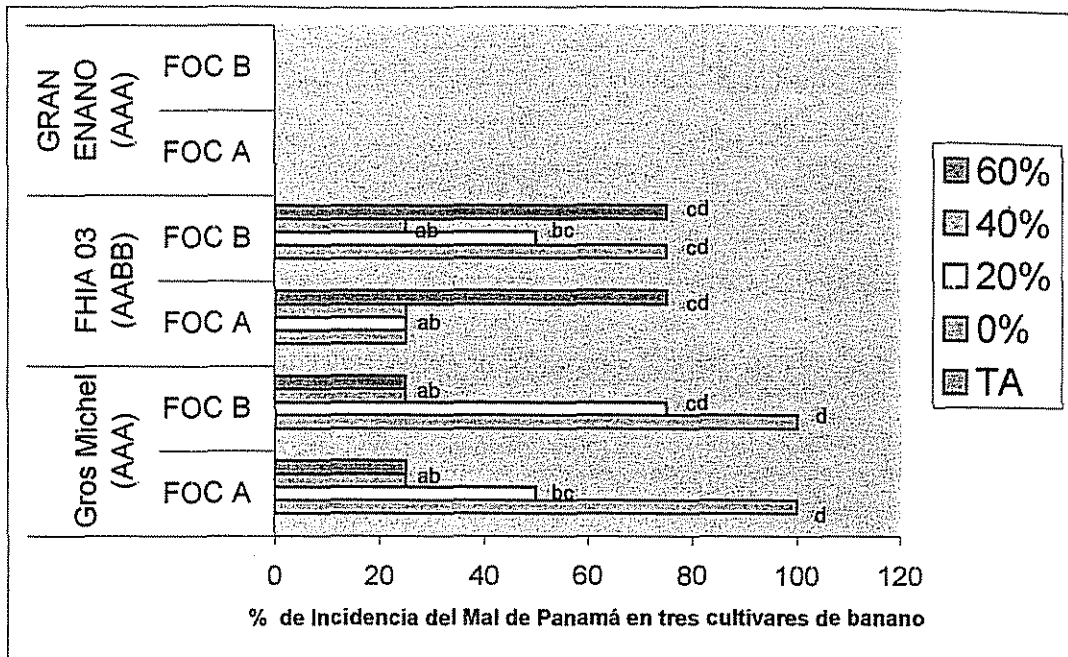


Fig. 10 Porcentaje de Incidencia de los aislados A y B en tres cultivares de banano al culminar el ensayo

En los datos de severidad interna medida en la decoloración del cormo en el cultivar susceptible Gros Michel (AAA), se observó una reducción significativa en las plantas preseleccionadas con concentraciones de 40 y 60 % del extracto crudo del hongo que plantas que no fueron preseleccionadas (Anexo 7). Estas plantas que no fueron preseleccionadas con el extracto crudo del hongo, presentaron una media de decoloración del 4.75 en comparación con solo el 0.5 en plantas preseleccionadas con 40 y 60 % del extracto crudo (Fig. 11)

Con relación al efecto de ambos aislados de FOC sobre los parámetros de crecimiento de la plantas, medidos por el peso radical y peso foliar se registraron

diferencias significativas entre plantas entre plantas correspondientes al testigo absoluto (TA) y plantas donde se aplicó el hongo. El efecto tóxico más drástico se registró con el aislado B en el cultivar Gros Michel (AAA) (Fig. 12), donde plantas que no fueron preseleccionadas con el extracto crudo de FOC el sistema radical fue totalmente destruido y no se pudo registrar este parámetro de crecimiento en la evaluación final del bioensayo a 3 meses después de la inoculación del hongo (Fig. 13). Así mismo, en los dos cultivares susceptibles Gros Michel (AAA) y FHIA-03 (AABB) plantas preseleccionadas con extractos crudos del hongo presentaron valores de peso radical y foliar superiores que plantas que no fueron preseleccionadas con la sustancia de selección de resistencia (Cuadro 4).

En el cultivar resistente Gran Enano (AAA) no se registraron diferencias significativas en el peso radical y peso foliar entre plantas testigo absoluto y plantas donde se aplicó el hongo. Asimismo no existieron diferencias en el peso radical y foliar entre plantas preseleccionadas y plantas no preseleccionadas con la sustancia de selección en condiciones *in vitro* (Cuadro 4, Fig. 14). Nuevamente estos resultados ratifican la resistencia completa de la variedad a la raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

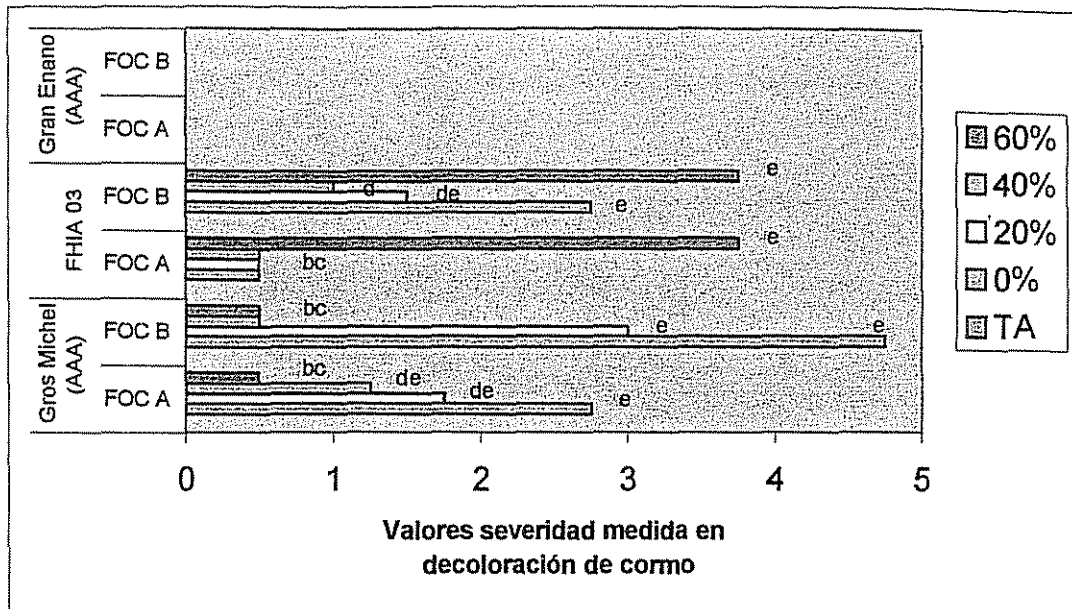


Fig. 11. Efecto del *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* sobre decoloración de corno en tres cultivares de banana



Fig. 12. Planta de la variedad Gros Michel (AAA) totalmente afectada por la toxicidad de la suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* aislado B

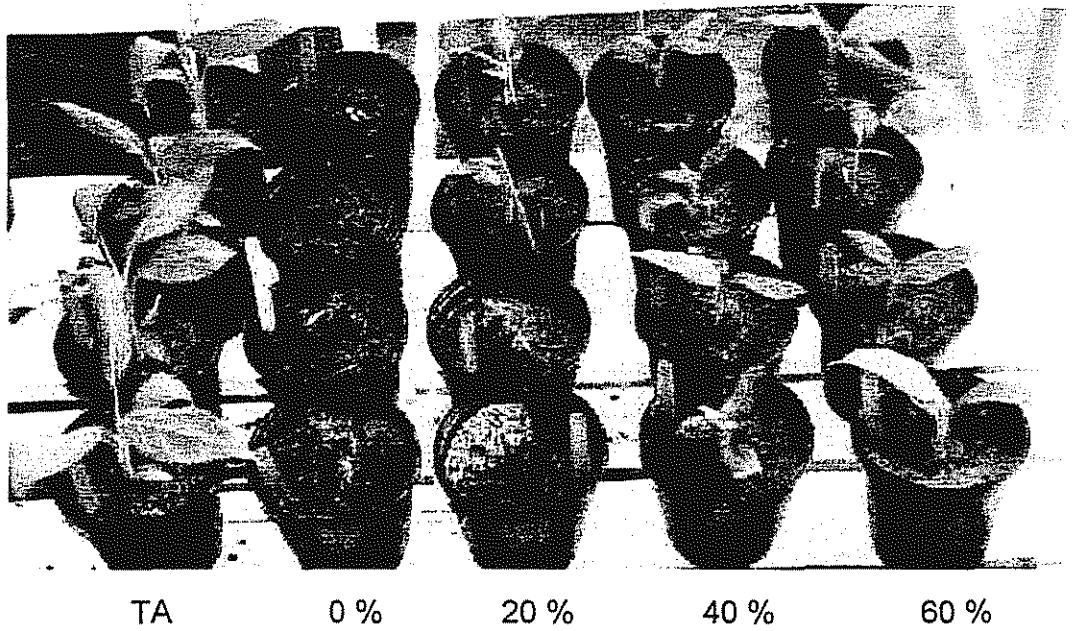


Fig. 13. Efecto del aislado B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* sobre la incidencia de la enfermedad en plantas de Gros Michel (AAA)

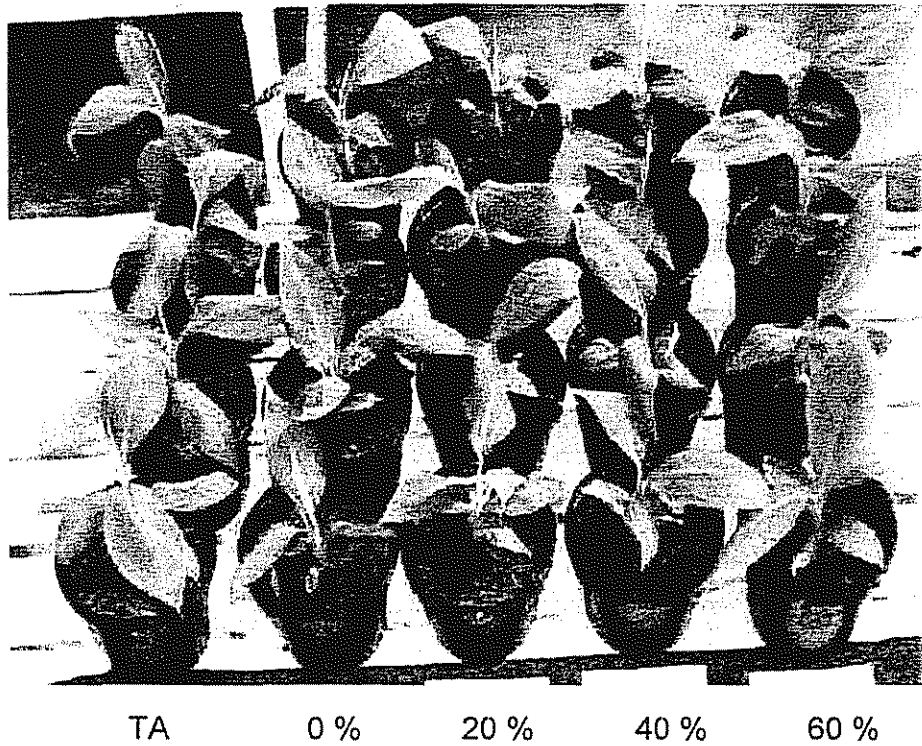


Fig. 14. Resistencia del cultivar Gran Enano (AAA) al efecto del aislado B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC).

Cuadro 4. Efecto de los aislados A y B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de sobre el crecimiento de plántulas en vivero

FOC A						
CONCENTRACIÓN	GROS MICHEL (AAA)		FHIA 03 (AABB)		GRAN ENANO (AAA)	
	PR	PF	PR	PF	PR	PF
TA	13,37 a	14,04 a	11,96 a	11,48 a	13,41 a	13,51 a
0 %	1,68 d	5,05 ab	4,42 bc	5,06 ab	14,33 a	15,02 a
20 %	8,66 a	7,25 a	7,15 a	7,13 a	13,24 a	13,47 a
40 %	2,82 d	3,78 d	10,01 a	8,00 a	12,42 a	13,16 a
60 %	9,08 a	9,49 ab	1,96 d	2,28 d	12,90 a	14,10 a

FOC B						
CONCENTRACIÓN	GROS MICHEL (AAA)		FHIA 03 (AABB)		GRAN ENANO (AAA)	
	PR	PF	PR	PF	PR	PF
TA	12,98 a	13,14 a	10,83 a	11,66 a	13,23 a	13,60 a
0 %	0,00 e	0,24 de	1,63 d	2,00 d	13,03 a	13,38 a
20 %	1,79 d	2,19 d	4,32 bc	5,75 a	13,73 a	13,61 a
40 %	3,69 cd	4,77 bc	5,66 a	6,15 a	12,63 a	14,16 a
60 %	5,79 ab	7,15 a	1,78 d	2,14 d	13,30 a	14,11 a

C* = concentraciones de extracto crudo de FOC. Tratamientos (promedio de 4 repeticiones) Solo en los cultivares Gros Michel (AAA) y FHIA 03 (AABB) en cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), aplicando prueba de Tukey.
 PR = Peso de raíces; PF = Peso de follaje.

En plantas de la variedad Gros Michel (AAA), se observó el efecto tóxico del extracto crudo de FOC. En el caso de la variedad Gros Michel (AAA) la incidencia de la enfermedad fue de 100 % en las plantas que estuvieron bajo efecto de 0 %

del extracto crudo de FOC en los dos anteriores bioensayos. Sin embargo, las plantas que estuvieron bajo la presión del extracto crudo de FOC, presentaron un nivel significativo de resistencia.

4.4 ANALISIS CUALITATIVO DE LA PRESENCIA DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN LOS EXTRACTOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

En los análisis de cromatografía de alta eficiencia (HPLC), cada aislado tuvo un comportamiento diferente, los cromatogramas presentan distintos perfiles según el aislado, el aislado A presenta mayor cantidad de compuestos aromáticos; mientras que el aislado B revela un perfil más complejo en cuanto al número de componentes que absorben a esta longitud de onda (Fig. 15).

La presencia de polifenoles en las sustancias micotóxicas, en el extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, es alta (Cuadro 5). Sin embargo, se puede observar que en el extracto crudo proveniente del aislado B se encontró mayor cantidad 54.90 respecto a 50.80 del aislado A. La presencia de polifenoles en los extractos crudos de FOC, tiene una repercusión importante debido al gran interés existente en la comunidad científica en encontrar microorganismos que produzcan sustancias para controlar ataque de insectos, patógenos y malezas (Greaves, 1992). Las micotoxinas son sustancias químicas tóxicas producidas por hongos

por una variedad de razones; estos incluyen para atacar o ganar el acceso a organismos huéspedes, ayudando a disolverse membranas de célula (Wink, 1999). La producción de micotoxinas dentro del hongo depende de las fuentes de alimento y las enzimas particulares del hongo y otros factores del entorno. Las micotoxinas generalmente no se encuentran en las esporas, pero son producidos generalmente en la etapa de micelio (Greaves, 1992; Wink, 1999).

El interés en las toxinas producidas por la especie de *Fusarium* ha aumentado mundialmente debido al descubrimiento de un número creciente de micotoxinas que tienen gran importancia práctica. Los intentos para usar el *Fusarium oxysporum* para controlar la forma anca de *Opuntia megacantha* patógeno que ataca las *cactáceas*, han encontrado éxito variable; la inoculación del cactus con el hongo ha dado resultados muy exitosos en cuanto al control de la enfermedad (Hilderbrand y McCain, 1978). Otro caso, el hongo *Ceratocystis fagacearum*, que ocasiona la marchitez del roble, ha sido usado con eficacia en Minnesota para convertir bosques marginales de roble en bosques de pinos (Weidermann y Tebeest, 1990). La inoculación de los robles con *C. fagacearum* se comparó con métodos químicos convencionales de control con 2, 4, 5-T. El control biológico fue decididamente más eficiente a causa de su costo inferior, su mayor facilidad de aplicación, un mayor porcentaje de mortalidad (Weidermann y Tebeest, 1990). En la actualidad se pretende buen uso de la especie *Fusarium* para el control de plantas ilícitas.

Cuadro 5. Compuestos secundarios observados en los aislados A y B de

Fusarium oxysporum f. sp. *cupense*

TANINOS	Absorbancia a 545 nm	Absorbancia a 590 nm	
Aislado A	0,0615	0,0525	
Aislado B	0.0265	0.0080	

ALCALOIDES	Extracto	ALCALOIDES	OTROS
Aislado A	Hexano	-	-
	Cloroformo	+++++	+++
	Aceto de Etilo	+++	+++
Aislado B	Hexano	-	-
	Cloroformo	++	+++
	Aceto de Etilo	+++	+++

MUESTRA	POLIFENOLES TOTALES
Aislado A	50.80
Aislado B	54.90

En la figura 15, se observa la gráfica de cromatografía de alta eficiencia (HPLC), los diferentes compuestos presentes en el extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* FOC aislado A y aislado B, se encuentran representados en cada pico de la curva. La cantidad de puntos críticos que indican cantidad de compuestos es menor en el la gráfica correspondiente al aislado A respecto a la gráfica de la en la cual esta representado el análisis de cromatografía de alta

eficiencia (HPLC) del aislado B. En esta gráfica, los diferentes compuestos presentes en el extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* FOC aislado B, es mayor cantidad especialmente la cantidad de polifenoles. Esta presencia de mayor cantidad de compuestos polifenólicos en el aislado B, podría estar relacionado con la mayor patogenicidad tanto a nivel *in vitro* como a nivel *in vivo* de la presente investigación.

AISLADO A

AISLADO B

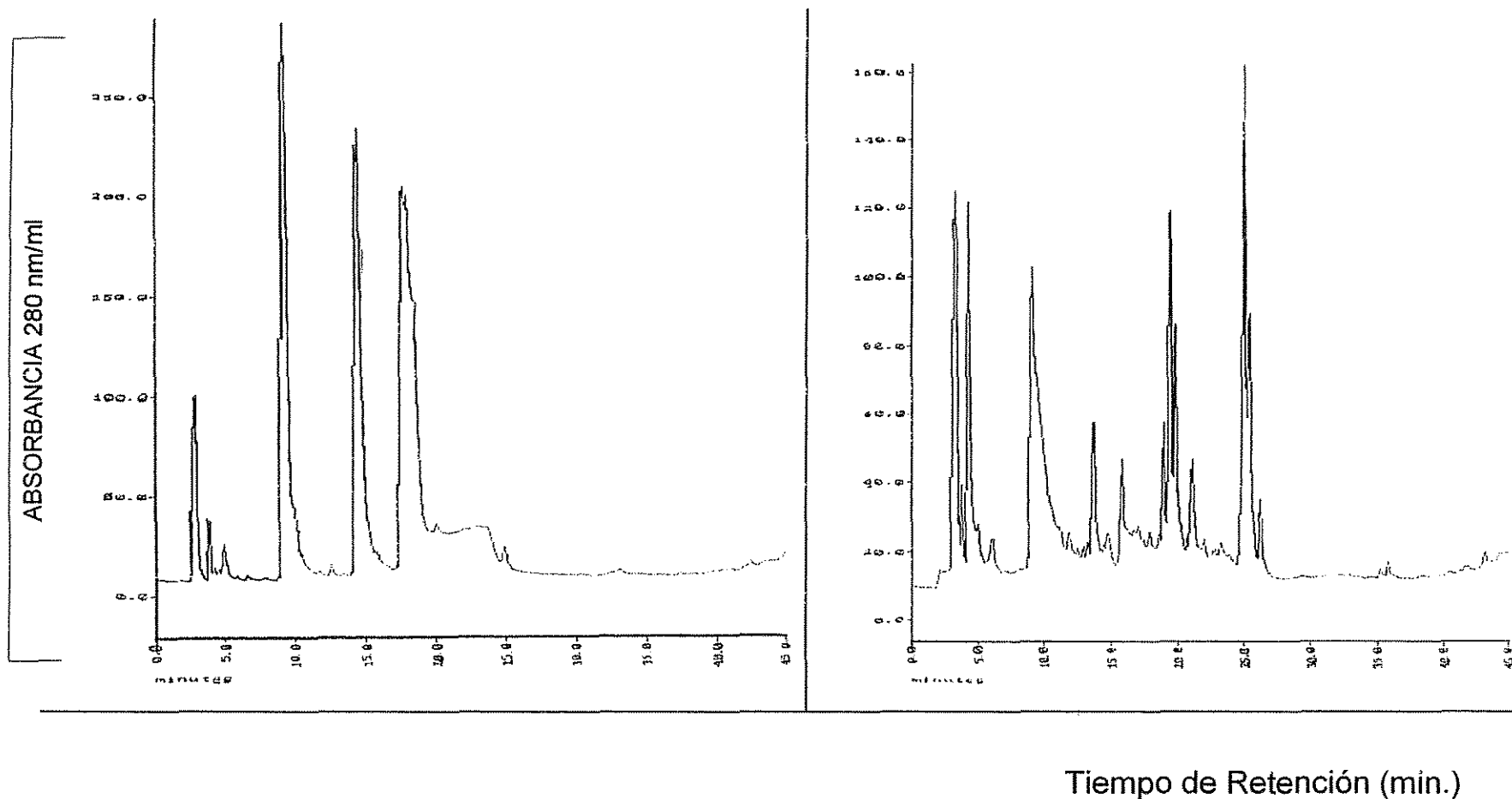


Fig. 15. Gráfica de cromatografía de alta eficiencia (HPLC) de los extracto crudo de los aislados A y B de FOC.

5 CONCLUSIONES

5.1.CONCLUSIONES

BAJO CONDICIONES *in vitro*:

MICROSECCIONES

1. Concentraciones de 80% y 100 % del extracto crudo del aislado A y B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) redujeron significativamente la brotación de las microsecciones en el cultivar susceptible Gros Michel (AAA) y en el híbrido medianamente tolerante FHIA 03 (AABB). Este efecto tóxico de altas concentraciones del extracto crudo del hongo indican que no son óptimas para ser utilizadas como agentes de selección de resistencia al Mal de Panama .

2-. Concentraciones del extracto crudo de ambos aislados de entre 20 y 60 % del extracto crudo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) permiten la formación de brotes laterales en las microsecciones, lo cual indica que estas concentraciones podrían ser usadas como agentes de selección de resistencia al Mal de Panama

3. Ninguna concentración del extracto crudo de 20 - 100% de aislado A y B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) redujo la brotación de las microsecciones en el cultivar resistente Gran Enano (AAA). Lo cual indica la

especificidad de las toxinas producidas por el hongo para infectar solamente los cultivares susceptibles. Estos resultados demuestran que la técnica de las microsecciones podría ser utilizada como una técnica temprana para la detección de genotipos resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (FOC)

A NIVEL DE VITROPLANTAS:

4. Concentraciones de 80 y 100 % del extracto crudo del aislado A y B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (FOC) redujeron significativamente el crecimiento radical y foliar de las vitroplantas del cultivar susceptible Gros Michel y del híbrido tolerante FHIA -03 (AABB). La alta toxicidad de estas concentraciones del extracto crudo del hongo indican que no son los niveles ideales para inducir resistencia en cultivares susceptibles a nivel in vitro.

5. Ninguna concentración del extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (FOC) tuvo un efecto toxico e inhibitorio del crecimiento de las vitroplantas del cultivar resistente Gran Enano (AAA), lo cual demuestra la especificidad de la toxinas del extracto crudo para afectar solamente cultivares susceptibles.

A NIVEL DE INVERNADERO:

1. La incidencia de la enfermedad en el cultivar susceptible Gros Michel (AAA) fue 75% inferior en plantas preseleccionadas a nivel in vitro bajo concentraciones de 40 y 60% del extracto crudo del hongo que en plantas que no fueron preseleccionadas. Estos resultados demuestran que la resistencia expresada a nivel in vitro persiste bajo condiciones de invernadero.

2. En el cultivar susceptible Gros Michel (AAA) la severidad de los síntomas externos de la enfermedad, correspondientes a amarillamiento y marchitez de las plantas fueron significativamente inferiores en plantas pretratadas y seleccionadas bajo concentraciones de 40 y 60% del extracto crudo del hongo que plantas que no fueron pretratadas con la sustancia de selección de resistencia.

3. El análisis de cromatografía de alta eficiencia (HPLC), de los aislados A y B de FOC, reportan diferencias de las gráficas de los aislados estudiados. En el extracto crudo del aislado B se puede observar mayor cantidad de polifenoles totales y esta situación podría estar relacionada con la mayor toxicidad de este aislado respecto al aislado A, que contienen mayor cantidad de taninos y alcaloides. Estos efectos de toxicidad se observaron tanto en la etapa de laboratorio como en invernadero.

6. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la resistencia de las plantas del cultivar Gros Michel (AAA) que soportaron la triple inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (FOC) en condiciones de campo, con el objeto de comprobar si la resistencia inducida al hongo bajo condiciones controladas a nivel in vitro e in vivo se expresa o mantiene a nivel de campo.
2. Es importante que se realicen estudios histológicos de plantas del cultivar Gros Michel (AAA) provenientes de líneas resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (FOC) para comprobar si durante el proceso de selección in vitro e in vivo ocurren cambios estructurales en los órganos y tejidos internos de la raíz y el corno de la planta, que podrían explicar el fenómeno de resistencia.
3. Es indispensable realizar estudios con diferentes concentración del extracto crudo del hongo entre 20 y 60% con el fin de encontrar una concentración ideal que sea utilizada para inducción de resistencia de plantas provenientes de microsecciones de corno de banano a nivel in vitro.
4. Es fundamental realizar estudios cromatográficos mas específicos para purificar parcialmente con el objeto de identificar y aislar las moléculas químicas presentes en el extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (FOC) que causan la toxicidad y son responsables de producir la enfermedad en la planta. Esta información permitiría emplear las moléculas aisladas como agente de selección de resistencia al patógeno.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, E. A.; Turner, D. W.; Sivasithamparam, K. 1999.** Paper presented during the 15th Annual Scientific Conference of the Federation of Crop Science. May 10-15, 1999. General Santos City. Philippines. pp. 45.
- Alabouvette, C. Lemanceau, P. Steinberg, C. 1993.** Recent Advances in the Biological Control of Fusarium Wilts. INRA. France. Pestic. Sci. 37:365-373.
- Albersheim, P.; Valent, B. S. 1978.** Host-pathogen interactions in plants: plants when exposed to oligosaccharides of fungal origin defend themselves by accumulating themselves by accumulating antibiotics. J. Cell. 78: 627-643.
- Alves E. J. 1993** Programa de melhoramiento genetico da banana e do platano na EMBRAPA/CNPMPF; planejamento, implatacao e progressos. Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas. 15(3):83-94,993.
- Arcioni, S.; Pezzoti, M. and Damiani, F. 1987.** *In vitro* selction of alfalfa plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Medicaginis*. Theor. Appl. Genet. 74:700-705.
- Arias , O.; Valverde, M. 1987.** Producción y variación somaclonal de plantas de banano variedad Grande Naine producida por cultivo de tejidos. Revista de la Asociación Bananera Nacional (ASBANA) Costa Rica 28: 6-11.
- Beauverie, J. 1901.** Essais d'immunization des vegetaux contre les maladies cryptogamiques. Comptes Rendus Hebdomadaries des Seances de l'Academie des Sciences, Paris 133:107-110.

- Banerjee, N. and DeLanghe, E. 1985.** A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Report* 4:351-354.
- Beckman, C. H. and Talboys, P.W., 1981.** Anatomy of resistance. In Mace, M.E. Bell, A.A. and Beckman, C.H. (eds.) *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press, New York, USA, pp. 487-521.
- _____. 1990. Host responses to the pathogen. pp. 93-105 In Ploetz, R. C. (ed.) *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN USA, 140 pp.
- Behnke, M. 1980.** General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans* *Theor. Appl. Genet.* 56: 151-152.
- Berg L.A.; and Bustamante, M. 1974.** Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. *Phytopathology* 64: 320-322.
- Bertley, S. 1999.** Development of a Molecular-Based Characterization and Detection System for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (FOC) in Banana. CRCTPP, UQ, St Lucia. In AUSTRALIAN BANANA RESEARCH & DEVELOPMENT PROJECTS, GENETIC IMPROVEMENT.
- Bosque-Pérez, N.B.; May, G.D. and Arntzen, C.J. 1998.** Applicability of an *Agrobacterium* system for the transformation of *Musa* species with diverse genomic constitution and ploidy level. *Acta Horticulturæ*, in press.
- Buiatti, M.; Scala, A.; Bettini, P.; Nascari, G.; Mopurgo, R.; Bogan, P.; Pellegrini, G.; Gimelli, F. and Ventura, R. 1985.** Correlations between *in*

- in vitro* response to fungal elicitors and toxic substances in carnation. *Theor. Appl. Genet.* 70:42-47.
- Buddenhagen, I. W. 1990.** Banana breeding and fusarium wilt. pp. 107-113. In: Ploetz, R. C. (ed.) . *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN USA, 140 pp.
- Cervone, F. Hahn, M. G., De Lorenzo, F., Darvill, F., and Albersheim, P. 1989.** Host-pathogen interactions. XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiology* 90, 542-548.
- Contreras, G. 1978.** La utilización del banano y el plátano como fuente calórica en la alimentación humana. In UPEB Memorias de la Primera Reunión Técnica: Planeamiento y Organización del Programa Coordinado de Investigaciones. Palmira. Colombia. pp. 201-203
- Corry, J.P.; Reed, W.L.; Curtis, W.R. 1993.** Enhanced recovery of solavetivone from *Agrobacterium* transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus* using integrated product extraction. *New York*, v. 42 (4) p. 503-508.
- Chuang, T. Y. 1988.** Studies on the soils suppressive to banana Fusarium wilt II. Nature of suppression to race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. In Taiwan Soils. *Plant Protection Bulletin*. Taiwan. 30, 125-134.
- Crouch, J. H. 2000.** Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.) pp. 22
- Cronauer, S.S. and Krikorian A.D. 1984.** Rapid multiplication of bananas and plantains by *in vitro* shoot tip culture. *HortScience* 19:234-235.

- Daniells, J.W. and Smith M. K. 1993.** Somatic mutation of banana –their stability and potential. In Valmayor, R. V., Hwang, S. C., Ploetz, R., Lee, S. W. and Rao, N. V. (eds) Proceedings: International Symposium on Recent Developments in Banana Cultivation Technology, Taiwan Banana Research Institute, Chiujju, Pingtung, Taiwan, 14-18 December 1992. INIBAP/ASPNET, Los Baños; Philippines, pp 162-171.
- Dantas, J. L.L., Shepherd, W.; Dos S. Soares Filho, Z. J., Cordeiro, S. DeO. E Silva, E.J. Alves, A. Da S. Sousa y Oliveira. 1993.** Programa de melhoramiento genético da bananeira em execucao no CNPMF/EMBRAPA: Abanicos obtidos, Cruz das Almas: EMBRAPA – CNPMF. 43P. (EMBRAPA – CNPMF. Documentos,47).
- Davis, A. J.; Say, M.; Snow, A. J. and Grant, B.R. 1994.** Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* to phosphonate. Plant Pathology. 43: 200-205.
- De Beer, Z. C and Visser, A. A. 1994.** Mutation breeding of banana in South Africa in Jones D. R. (ed) The improvement and testing of *Musa*: A global partnership. Proceedings of the first global conference of the International *Musa* Testing Program held at FHIA, Honduras. 27-30 April 1994. pp. 243-247.
- Dhed'a, D., Dumortier, F., Panis, B., Vuylsteke, D. and DE, Langhe E. 1991.** Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp, ABB group). Fruits 46: 125-135.
- Deverall, B. Y Dan, E. 1995.** Induced resistance in legumes. In : P. Hammerschmidt y J. Kuc, eds. Induced resistance to disease in plants. The Nerthenlands, Kluwer. Academic publisher. pp 152-168.

- Domínguez, X.A. 1988** Métodos de investigación Fitoquímica Editorial Limusa. 285 pp.
- Dorado, A. A. 1999.** MICORRIZAS ARBUSCULARES EN AGROECOSISTEMAS DE LA AMAZONIA COLOMBIANA. Simbiontes del Suelo. Bogota. Colombia pp. 65-79.
- Ellis, F. 1983.** Las transnacionales del banano en Centro América. San José, Costa Rica. 463 p.
- Escalant, J.V. and Teisson, C. 1989.** Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell Reports 7:665-668.
- Escalant, J.V. 1990.** Using tissue culture techniques for production of new varieties of plantain and early screening against black Sigatoka. In Fullerton, R. A. and Stover R. H. (eds) Sigatoka leaf Spot Diseases of Banana, Proceeding of an International Workshop held at San José, Costa Rica. March 28 april 1, 1989. INIBAP, Montpellier, France, pp. 338-348.
- Escalant J.V., Paduscheck C., Babeau J., and Teisson C. 1993.** Somatic embryogenesis in triploid banana cultivars. In: Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests. J. Ganry. Montpellier, CIRAD and INIBAP. pp. 313-316.
- Escalant, J.V.; Cote, F.; Grappin, A.; Aubiron, E.; Legavre, T.; Lagoda, P.; Carreel, F.; Bakry, F.; Horry, J. P.; Kerbelec, F.; Teisson, C.; and Tezenas Du Montcel, H. 1994a.** Biotechnologies for *Musa* improvement – strategies and results. In INIBAP (ed.) Banana and Plantain Breeding: Priorities and Strategies, Proceeding of the First Meeting of the *Musa*

Breeders' Network held in La Lima, Honduras, 2-3 May 1994. INIBAP, Montpellier, France. pp. 22-26.

Escalant, J. V.; Teisson, C.; and Cote, F. 1994b. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* sp.) In Vitro Cell Development Biology 30P. 181-186.

FAO, 2001*. Informe sobre producción y demanda de rubros agrícolas. Octubre 2001. <http://www.fao.org>.

Flor, H. H. 1971. Currents status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology): 275-296.

French E. R. y Hebert, T. T. 1982. Métodos de Investigación fitopatológica. IICA. Costa Rica. pp 287.

Frison, E. y Sharrock S. 1998. The economic, social and nutritional importance of banana in the world. In Bananas and food security. International Symposium, INIBAP, Douala, Cameroon 10- 14 November, 21-35.

Greaves, M.P. 1992. Mycoherbicides: the biological control of weeds with fungal pathogens. Pflanzes.- Nachricht. Bayer 45, 21-30.

Haarer, A.E. 1964. Modern banana production, Londres. Leonard Hill, 136 p.

Harborne, J. B. 1984. Phytochemical Methods, A guide to modern techniques of plant analysis, 2da. Ed.

Herbert, J. A. and Marx, D. 1990. Short-term control of Panama disease of bananas in South Africa. Phytophylactica 22, 339-340.

- Hildebrand, D.C. and McCain, A.H. 1978.** The use of various substrates for large scale production of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cannabis* inoculum. *Phytopathology* 68: 1099-1101.
- Hwang, S.C. 1986.** Variation in banana plants propagated through tissue culture. *Journal of the Chinese Society of Horticultural Science* 32, 117-125.
- Hwang, S.C. 1991.** Somaclonal resistance in Cavendish banana to *Fusarium* wilt. *Plant Protection Bulletin (Taiwan)*. 33, 124- 132.
- Hwang, S.C. Cook R. J. and Haglund, W.A. 1982.** Mechanisms of suppression of chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* in soils. *Phytopathology* 72:655-659.
- Hwang, S.C. and Ko, W.H. 1987.** Somaclonal variation of bananas and screening for resistance to fusarium wilt pp 151-156. In *Banana and plantain breeding strategies*. Perley, G. J. Y E.A. De Langhe (eds.). Proceedings of an international workshop held at Cairns, Australia, 13-17 October. ACIAR Proceedings. No. 21.
- Hwang, S.C. and Ko, W.H. 1988.** Mutants of Cavendish banana resistant to race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Plant. Prot. Bull. (Taiwan)* 30:382-392.
- Hwang, S.C. 1999.** Recent development on fusarium R&D of banana in Taiwan. In *Banana Fusarium wilt management: Towards sustainable cultivation*. pp.39-49.
- Israeli, Y.; Lahav, E. and Reunevi, O. 1995.** *In vitro* culture of bananas. In Gowen S (ed.) *Bananas and Plantains*. Chapman and Hall, London, pp. 147-178.

- Jaizme-Vega, M. C.; Sosa B.; Hernández, J. M. 1997.** Interaction of Arbuscular mycorrhizal fungi and the soil pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* of the first stages Micropropagated Grande Naine banana. In International Symposium on Banana in the Subtropics. pp.285-295.
- Jones, D. R. 2000a.** Diseases of Banana, Abacá and Enset. CABI Publishing. USA pp. 547.
- Jones, D. R. 2000b.** Banana breeding for Disease Resistance. In Diseases of Banana, Abacá and Enset. CABI Publishing. USA. pp. 425 – 434.
- Keen, N. T.; Partridge, J. E.; Zaki, A. I. 1972.** Pathogen produced elicitor of a chemical defense mechanisms in soybeans monogenically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology* 62: 768.
- Keen, N. T.; 1975.** Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens. *Science* 187: 74-75.
- Krikorian, A. D.; Irizarry, H. Cronauer Mitra, S. S. and Rivera, E. 1993.** Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa* AAB) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Annals of Botany* 71, 519-535.
- Kroon , B.A.M., Scheffer, R.J., El Gersma, D.M. 1991.** Induced resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt invoked by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Netherlands. *Journal Plant Pathology*. 97:401-408.
- Kuc, J. 1993.** Non pesticide control of plant disease by immunization. In Lyr, H; Potter, C. Ed. Stuttgart, Ullmer Publication. pp. 225-237.
- Kuc, J. 2001.** Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application. *European Journal of Plant Pathology* 107: 7-12.

- Lakshman, P.; Selvaraj, P.; and Mohan, S. 1987.** Efficacy of different methods for the control of Panama disease. *Trop. Pest Magnt.* 33:373-376.
- Linderman, R. G. 1992.** Vesicular arbuscular mycorrhizal and soil microbial interactions. In *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Bethlenfalvay, G. J. y Linderman, R. G. (Eds.). ASA Special Publication, Madison, WI. pp. 45-70.
- Lockhart, B. E. L.; Jones, D. R. 2000a.** Banana Mosaic. In *Diseases of Banana, Anacá and Enset*. (eds) D.R. Jones. 2000. pp. 256-263.
- Lockhart, B. E. L.; Jones, D. R. 2000b.** Banana Streak. In *Diseases of Banana, Anacá and Enset*. (eds) D.R. Jones. 2000. pp. 263-274.
- Lorito, M.; Harman, G.E.; Hayes, C.K.; Broadway, R.M.; Tronsmo, A.; Woo, S.L. and Di Pietro, A.; 1993.** Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Lyon, G. D.; Newton, A. C. 2000.** Implementation of elicitor mediated induce resistance in agriculture. In *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture*. Agrawal, AA; Tuzun, S.; Bent, E. Eds. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press. pp. 299-318.
- Ma, S.S. 1988.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. In: *Proceedings Conference on Applications of Horticultural Plant-tissue Breeding*. pp. 181-188 (in Chinese, with English summary).
- Magnaye, L. V. 1999.** Status of Panama disease in the Philippines. In *Banana Fusarium wilt management: Towards sustainable cultivation*. INIBAP October 18-20. pp. 50 – 57.

Marois J., 1998. Biological Control of diseases caused by *Fusarium oxysporum*. La Lima, Honduras 1989. p. 77-81. In Ploetz, R. C. (ed.) . *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN USA, 140 pp.

Marois, J.J. and Mitchell, D.J. 1981. Effect of fumigation and antagonistic soil fungi on the relationships of inoculum density to infection and disease severity in *Fusarium* crown rot of tomato. *Phytopathology* 71: 167-170.

Matsumoto, K., and Yamaguchi, H. 1989. Nonwoven materials as a supporting agent for in vitro culture of banana protocorm-like bodies. *Trop. Agric. (Trinidad)* Vol 66 No. 1 enero.

Matsumoto, K., Barbosa, M. L., Souza, L. A. C., Teixeira, J. B. 1995. Race 1 *Fusarium* wilt tolerance on banana plants selected by Fusaric acid. *Euphytica*. 84: 67-71.

Matsumoto, K. and Oka, S. 1998. Plant regeneration from protoplasts of Brazilian dessert banana (*Musa* spp., AAB group) *Acta Horticulturae*. 490: 455-462.

Matsumoto, K.; Barbosa, M. L.; Copati Souza, L. A.; Teixeira, J. B. 1999. In vitro selection for *Fusarium* wilt resistance in banana. II. Resistance to culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Fruits*. 54: 97-102.

May, S. y Plaza, G. 1958. La United Fruit Co. en América Latina. USA. National Planning Association, 291 p.

- May, G., Afza, R., Mason, H., Wiecko, A., Novak, F. and Arntzen, C. 1995.** Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via Agrobacterium-mediated transformation. *Bio/Technology* 13:486-492.
- Mendes, B. M.; Rodríguez, B. I. y Neto, T. 1993.** Effect of toxic filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on the development of banana (*Musa* spp.) shoot tips. *Fitopatología Brasileira* 18 (2) junio. pp. 194- 198.
- Moore, N. Y.; Bentley, S.; Pegg, K.G. and Jones, D. R. 1995.** Fusarium wilt of banana. *Musa* disease fact sheet No. 5. INIBAP: 1-4.
- Moore, N. Y., Pegg, K.G., Smith, L. J., Langdon, P. W., Bentley, S., y Smith M. K. 1999.** Fusarium wilt of banana in Australia. In *Banana Fusarium wilt management: Towards sustainable cultivation*. 64-75
- Murashige, T., y Skoog, F., 1962.** A revised médium for rapid growth and assys with tobacco tissue cultures", *Physiology Plantarum*, 15: 473-497.
- NCGR, 1998.** <http://www.ncgr.org/gpi/odyssey/agbio/foods.html>.
- Novak, F.J., Afza, R., Van Duren, M., Perea-Dallos, M., Conger, B.V. and Xiaolang, T. 1989.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology* 7:154-159.
- Okole, B. N., and Schulz, F. A. 1997.** Selection of *Mycosphaerella fijiensis* – resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain. *Plant Cell Reports*. 16: 339-343.

- Orjeda, G. 1998.** Evaluación de la resistencia de los bananos a las enfermedades de Sigatoka y marchitamiento por *Fusarium*. PROMUSA, IPGRI, INIBAP. pp. 64
- Ortiz, R. 1995.** *Musa* genetics. In: Bananas and Plantains. S. Gowen. London, Chapman and Hall. pp. 84-109.
- Ortiz, R., and VUYLSTEKE, D. 1996.** Recent advances in *Musa* genetics, breeding and biotechnology. Plant Breeding Abstracts 66:1355-1363.
- Ortiz, R., and Vuylsteke, D. Crouch, J. H. 1998.** Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.) Plant Biotechnology. Vol 1: 1, april 15.
- Osuji, J.O., Harrison, G., Crouch, J.H. and Heslop-Harrison, J.S. 1997.** Identification of the genomic constitution of *Musa* L. genotypes (bananas, plantains and hybrids) using molecular cytogenetics. Annals of Botany 80:787-793.
- Panis, B., Van Wauwe, A. and Swennen, R. 1993.** Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). Plant Cell Reports 12: 403-407.
- Pegg, K. G. and Langdon, P. W. 1987a.** Banana and breeding strategies. Proceeding No. 54, Amer. Soc. of Agro. pp.45-70.
- _____ **1987b.** *Fusarium* wilt (Panama disease): a review. In: Persley, G. and Delanghe, E. A. (eds) Banana and Plantain Breeding Strategies, Proceedings of an International Workshop held at Cairns, Australia, 13-17 October 1986. ACIAR Proceeding No. 21,

Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia, pp.119-123.

Pegg, K. G.; Moore, N. Y. and Bentley, S. 1996. Fusarium wilt of banana in Australia: A review. *Aust. J. of Agric. Res.* 47 (5): 637-650.

Perea, M. 1998. Consideraciones Biotecnológicas para el Mejoramiento de las Musáceas In: Seminario Internacional sobre Producción de Plátano. Memorias. 4 al 8 de mayo de 1998. Quindío. Armenia. Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA. Universidad de Quindío. Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA-Quindío. Comité Departamental de Cafeteros del Quindío. p. 63-70.

Ploetz, R., Herbart, J., Sebasigari, K., Hernández, J., Pegg, K., Ventura, J., and Mayato, L. 1989. Importance of *Fusarium* wilt in different Banana-Growing Regions. pp 9-26. In: Ploetz, R. C. (ed.) . *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN USA, 140 pp.

Ploetz R. C. and Correll, 1988. Vegetative comparative among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Dis.* 72: 325- 328.

Ploetz, R. C. 1989. Factors influencing the development of fusarial wilt of banana (Panama disease). *Phytopathology* 79, 1181.

Ploetz, R. C. 1990. Population biology of *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense*. pp. 63-76. In Ploetz, R. C. (ed.) . *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN USA, 140 pp.

_____. 1992. Fusarium wilt of banana (Panama disease). In Mukhopadhyay, A.N., Chaube, H. S., Kumar, J. and Singh, U. S. (eds) *Plant*

Diseases of International Importance, Vol. III. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, pp. 270-282.

Ploetz, R. C. 1994. Panama disease: return of the first banana menace. *International Journal of pest management*. 40 (4). p. 326-336.

Ploetz, R. C. and Pegg, K. G. 1997. Fusarium wilt of banana and Wallace's line: was the disease originally restricted to the Indo-Malayan region? *Australasian Plant Pathology* 26, 239-249.

Ploetz, R. C. and Pegg, K. G. 2000. Fusarium Wilt. In *Diseases of banana, Abacá and Enset*. pp 143 – 159.

Pocasangre L.; Villich, V.; Schuster, R-P. und Sikora, R. A. 1998. Biologische Bekämpfung der Panama-Krankheit (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*) mit pilzlichen Endophyten. In 51. Deutsche Pflanzenschutztagung, Deutsche Phytomedizinische Gessellschaft, 5-8 Oktober, 1998. Halle/ Saale, Germany.

Pocasangre. L. 2000. Biological control of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panamá disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*). Ph. D thesis, University of Bonn. 95 p.

Promusa Supplement. 1999. Abstracts from the International symposium on the molecular and cellular biology of bananas, Boyce Thompson Institute, Ithaca, NY, USA March 1999, *InfoMusa* 8:(1) June 1999. 16 pp.

Ray, J. 1901. Les maladies cryptogamiques des vegetaux. *Revue Generale de Botanique* 13: 145-151.

Remy, S., Francois, I., Schoofs, H., Panis, B., Cammue, B., Swennen, R. and Sagi, L. 1998. Genetic transformation as a technology to create disease resistance in banana. *Acta Horticulture*. In press.

Riveros, A. 2001. Moléculas activadoras de la resistencia inducida, incorporadas en programas de agricultura sostenible. CATIE. 17 p.

Riveros, A. and Leopivre, P. 1998. Mecanismos de Defensa Asociados con la Resistencia Total en la Interacción *M. Fijensis* - *Musa* In: Seminario Internacional sobre Producción de Plátano. Memorias del 4 al 8 de mayo de 1998. Quindío. Armenia. Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA-Universidad del Quindío. Servicio Nacional de Aprendizaje- SENA- Quindío. Comité Departamental de Cafeteros de Quindío. P. 59-62.

Rowe, P .R. 1976. Possibilités d'amélioration génétique des redements de plantains. *Fruits* 31(9): 531-539.

_____ **1983.** Mejora de los plátanos de postre y los plátanos para cocer. United Fruit Co. La Lima, Honduras. Reunión IV, ACORBAT, mayo 1993.

_____ **1990.** Breeding bananas and plantains for resistance to Fusarium wilt: The track record. pp 115-119. In: Ploetz, R. C. (ed.) . *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN USA, 140 pp.

Rowe, P. R. and Rosales, F. 1994. Musa breeding at FHIA. In Jones, D.R. (ed.) *The Improvement and International Testing Program held at FHIA, Honduras, 27-30 April 1994*. INIBAP, Montpellier. France, pp. 117-129.

Rowe, P. R. and Rosales, F. 1996. Bananas and plantains. In: Fruit Breeding. Vol. 1: Tree and Tropical Fruits. J. Janick and J. Moore. New York, John Wiley. pp. 167-211.

_____ **2000.** Conventional Banana Breeding in Honduras. In Diseases of Banana, Anacá and Enset. (eds) D.R. Jones. 2000. pp 435-449.

Ruiz, C. A., 1995. Efectos de sustratos sobre bacterias antagónicas a *Mycospharella fijiensis* en banano. Tesis Mag: Sc Turrialba, CR., CATIE XV; 115 p.

Sagi, L., Remy, S., Panis, B., Swennen, R. and Volckaert, G. 1994. Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. 'Bluggoe', ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. Plant Cell Reports 13: 262-266.

Sagi, L., Panis, B., Remy, S., Schoofs, H., De Smet, K., Swennen, R. and Cammue, B. 1995. Genetic transformation of banana (*Musa* spp.) via particle bombardment. Bio/Technology 13:481-485.

Sagi, L. 2000. Engineering Resistance to diseases caused by Fungi. In Diseases of Banana, Abacá and Enset. p. 482-492.

Salgado, M. O., y Schwartz H. P. 1994. Resistense to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* in Tepary Beans (*Phaseolus acutifolius*). The American Phytopathological Society. Plant Disease. Vol 78 357-360.

San Segundo, B., Vila, L., Rufart, M., Bravo, J. L., Murillo, I. 1999. Utilización de genes de defensa para la mejora genética de plantas. Departamento de

Genética Molecular, Centro de Investigación y Desarrollo de Barcelona, CSIC. Jorgi Girona España.

Sandoval, J. A.; Tapia, F. A. C.; Miller, L. and Villa Lobos, A. B. 1991. Observation about the variability encountered in Micropropagated plants of *Musa* cv. 'False Horn' AAB. *Fruits* 46, 533-539.

Shepherd, K. 1968. Banana breeding in the West Indies. Pest Articles and News Summary. Section B 14: 370-379.

Sikora, R. A. and Shuster, R. P. 1999. Novel approaches to nematode IPM. In Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. 23-28 November. pp 127- 136.

Simmonds N.W. 1962. Evolution of the Bananas. London, Longmans.

Simmonds N.W. 1973. Los Plátanos. Barcelona. España. 1973. 540 p.

_____. 1997. Pie in the sky. Tropical Agriculture Association Newsletter, June 1997:1-5.

Smith, L. J.; Smith, M. K.; Hamill, S. D.; Hunter, M. N.; Pegg, K. G.; Galea, V. J. 1999. Towards improving resistance of Micropropagated bananas and mycorrhizae I. Bioassay development. In Banana Fusarium Wilt management: Towards sustainable cultivation. INIBAP 18-20 October. pp. 224-233.

Smith, M. K. 1988. A review of factors influencing the genetic stability of Micropropagated bananas. *Fruits* 43, 219-123.

- Smith, M. K. and Drew, R. A. 1990.** Growth and yield characteristics of dwarf off-types recovered from tissue-cultured bananas. *Australia Journal of Experimental Agriculture* 30, 575-578.
- Smith, M. K. Whiley, A.W., Searle, C. Langdon, P.W., Schaffer, B. and Pegg, K. G. 1998.** Micropropagated bananas are more susceptible to *Fusarium* wilt than plants grown from conventional material. *Australian Journal of Agricultural Research* 49, 1133-1139.
- Stakman, E. C. 1915.** Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agric. Res* 4: 193-199.
- Stover, R. H. 1962.** *Fusarial* Wilt (Panama Disease) of bananas and other *Musa* species. *Phytopathol.* p. 4.
- Stover, R. H. 1986.** Disease management strategies and the survival of the banana industry. Division of Tropical Research, United Fruit Company. p 83 – 91.
- Stover, R. H. 1987.** Somaclonal variation in “Grand Nain” and “Saba” bananas in the nursery and field. In: Persley, G. J. and De Langhe, E. A. (eds) *Bananas and Plantain Breeding Strategies. Proceedings of an International Workshop, Cairns, Australia.* ACIAR Proceedings No. 21, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia, pp. 136-139.
- _____. **1990.** *Fusarium* wilt of banana: Some history and current status of the disease. La Lima, Honduras 1989. p. 1-7. In Ploetz, R. C. (ed.) *Fusarium Wilt of Banana.* APS Press, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN USA, 140 pp.

- Stover, R. H. and Simmonds, N. W. 1987.** Bananas 3er ed. Longmans Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK, . 468 pp.
- Sun, E. J.; Su, H. J. and Ko, W. H. 1978.** Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* race 4 from soil or host tissue by cultural characters. *Phytopathology*. 68:1672-1673.
- Sun, E. J. and Su, H. 1984.** Rapid method for determining differential pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using banana plantlets. *Tropical Agriculture*. 61:7-8.
- Su, H. J., Hwang, S. C. and Ko, W.H. 1986.** Fusarial wilt of Cavendish bananas in Taiwan. *Plant Disease*. 70: 814-818.
- Tang, C. Y., and Hwang, S. C. 1994.** Musa mutation breeding in Taiwán. In Jones D.R. (ed.) *The Improvement and testing of Musa; a Global Partnership, Proceedings of the First Global Conference of the International Testing Program held at FHIA, Honduras, 27-30 april 1994.* INIBAP, Montpelliert, France, pp.219-227.
- Tang, C. Y., and Hwang, S. C. 1998.** Selection and asexual inheritance of a dwarf variant of Cavendish banana resistant to race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38, 189-194.
- Thomas, J. E.; Iskra-Caruana, M. L.; Magnaye, L. V.; Jones, D. R. 2000.** Bract Masaic. In *Diseases of Banana, Anacá and Enset.* (eds) D.R. Jones. 2000. pp. 253- 256.
- Toussoun, T. A. 1975.** *Fusarium*- suppressive soils. In Bruehl, G. W. (ed.) *Biology and Control of Soil-Borne. Plant Phathologens.* APS, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 145-151.

- Umaña G.; Saenz, M.; Umaña, D. 2000.** Manejo postcosecha en banano y cacao orgánicos Asociación de Pequeños Productores de Talamanca APPTA. Labor. Postcosecha Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), UCR. pp 37-39.
- Unión de Países Exportadores de Banano. 1978.** Banano y Plátano en la alimentación humana. Informe Mensual. 2(5):23.
- Vuylsteke, D. R.; Swennen, R. I. and De Langhe, E. A. 1991.** Somaclonal variation in plantains (*Musa* spp., AAB group) derived from shoot-tip culture. *Fruits* 46:429-439.
- Vuylsteke, D., Ortiz, R., Ferris, S. and Swennen R. 1995.** 'PITA-9': a black-sigatoka-resistant hybrid from the 'False Horn' plantain gene pool. *HortScience* 30:395-397.
- Vuylsteke, D. R. 1989.** Shoot-tip culture for the propagation, conservation, and exchange of *Musa* Germplasm. Practical Manuals for Handling Crop Germplasm *in vitro* 2. Rome, International Board for Plant Genetic Resources. pp. 15-34.
- Vuylsteke, D. R.. 1998.** Field performance of banana micropropagules and somaclones. In: Somaclonal Variation and Induced Mutation in Crop Improvement. S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. pp. 219-231.
- Vuylsteke, D. and Ortiz, R. 1996.** Field performance of conventional vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa* spp., AAB group). *HortScience* 31:862-865.

- Waite, B. H. 1977.** Inoculation studies and natural infection of banana varieties with races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. In: Plant Disease Reporter p.p. 15-19. Enero. Vol, 61, No. 1.
- Weidemann, G.J. and Tebeest, D.O. 1990.** Genetic variability of fungal pathogens and their weed hosts. Microbes and Microbial products as herbicides. American Chemical Society, Washington, DC., pp. 176-183.
- Weising, K., Khan, F., Kaemmer, D., Fischer, D. and Kahl, G. 1996.** Microsatellite-based molecular markers and their application for genome analysis in *Musa* cultivars and wild species. In: Report of the 1st FAO/IAEA Research Co-ordination Meeting on Cellular Biology and Biotechnology for Creation of New Useful Banana Genotypes, 20-24 Nov. 1995, Vienna, Austria. Vienna, FAO/IAEA. pp. 57-59.
- Wink, M. 1999.** Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Annual Plant Reviews. pp. 2-70.
- Wong, W. C. 1986.** In vitro propagation of banana (*Musa spp.*): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media, Plant Cell, Tissue Organ Cult. 6 159-166.
- Yamaguchi, K., Mayumi, K., Arita, M., Takahashi, 1992.** Induction of Systemic Resistance by *Fusarium oxysporum* MT0062 in Solanaceous Crops. Ann Phytopathol. Soc. Japan 58: 16-22.
- Yun, D.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. 1997.** Plant antifungal proteins. Horticultural Review 14:39-87.

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio PDA para el cultivo del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

- 1-. Se colocaron 39 gramos de PDA Difco y 5 gramos de agar en beaker de 1 litro.
- 2-. Se disolvieron en 1 litro de agua bidestilada.
- 3-. Se agitó la solución en una plancha de calentamiento a alta temperatura, hasta ebullición.
- 4-. La solución del medio se esteriliza por 20 minutos en autoclave a 120 ° C y 1,5 bar de presión.
- 5-. Se dispensaron platos Petri estéril con 25 ml. en la Cámara de Flujo Laminar
- 6-. Se dejaron reposar los platos Petri dentro de la cámara para que no se formara vapor de agua dentro del plato Petri.
- 7-. Se almacenó el medio en una cámara de medios a una temperatura de 3 a 4 °C.

Anexo 2. Composición química del medio para el cultivo de *Musa* sp. basado en sales de Murashige y Skoog, utilizadas rutinariamente, en el Laboratorio de Biotecnología de CATIE.

	CONSERVACIÓN	MULTIPLICACIÓN	DESARROLLO
MACRO	50 ml/l	50 ml/l	50 ml/l
MICRO	5 ml/l	5 ml/l	5 ml/l
HIERRO	5 ml/l	5 ml/l	5 ml/l
VITAMINAS	2 ml/l	2 ml/l	2 ml/l
BAP		2,5 ml/l	
SACAROSA	40-70 g/l	40 g/l	40-50-70 g/l
AC. ASCÓRBICO	10mg/l		
pH	5,8	5,8	5,8
GELRITE	2 g/l	2 g/l	2 g/l

Anexo 5. Preparación de medio Murashige y Skoog (MS) empleado en multiplicación de *Musa* sp.

- 1-. Se midieron las cantidades especificadas de cada compuesto.
- 2-. Se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada exceptuando el Gelrite.
- 3-. Se agitó y se aforó con agua bidestilada hasta el la medida de litro.
- 4-. Se coloca en plancha de agitación, se mide el pH y se ajusta a 5,8.
- 5-. Se agrega el Gelrite manteniendo la agitación hasta que disuelva.
- 6-. En un beacker de 1 litro se colocó la mezcla y me introdujo al microondas por 10 min.

- 7-. Se dispensó en los tubos o envases de cultivo.
- 8-. Se llevó al autoclave por 20 min. a 121 ° C.
- 9-. Se dejó enfriar y se refrigeró.

Anexo 4. Composición química del medio CZAPEK DOX (CD) (French y Hebert, 1982)

Reactivo	Cantidad (g)
Sacarosa	30
Na NO ₃	3
KH ₂ PO ₄	1
KCL	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
AGUA BIDEDESTILADA	1 litro
PH	5,8

Anexo 5. Preparación de Medio Czapek DOX para obtención del extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

- 1-. Se disolvieron los reactivos en un beacker de 1 litro.
- 2-. Se colocó el beaker en una plancha de agitación.
- 3-. Se ajusta el pH a 5,8.

- 4-. Se dispensaron alícuotas de 100 ml en Earlenmeyer de 250 ml.
- 5-. Se cerraron herméticamente los Earlenmeyers con tapa de rosca o corchos de algodón.
- 6-. Se autoclavó el medio por 20 min. a 121° C.
- 7-. Se dejó enfriar para ser utilizado en cultivo líquido del FOC.

Cultivo de Hongo en Medio Líquido (CD):

- 1-. Se seleccionaron platos de FOC de 8 días de crecimiento (Esporulados).
- 2-. Se extrajeron discos de 5 mm de diámetro de agar conteniendo macro y microesporas, todo esto dentro de la cámara de flujo laminar.
- 3-. Se colocaron 5 discos por cada Earlenmeyer conteniendo el medio CD.
- 4-. Se colocaron los Earlenmeyer en agitación en Shaker por 15 días a 95 rpm.

Anexo 6. Efecto del aislado A y B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), sobre la incidencia y severidad del Mal de Panamá en tres cultivares de *Musa* en condiciones de Invernadero

FOC A	1 OBSERVACION			2da OBSERVACION			3era. OBSERVACION		
	<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>	
Concentración	A	M		A	M		A	M	
GROS MICHEL (AAA)									
TA	0 a	0 b	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
0 %	25 ab	1 d	1 d	25 ab	1 d	1 d	100 d	2,5 de	2,75 de
20 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	50 bc	1,75 d	1,51 d
40 %	25 ab	0,75 cd	0,75 cd	25 ab	0,75 cd	0,75 cd	25 ab	1 d	1 d
60 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	25 ab	0,5 bc	0,25 ab
FHIA03 (AABB)	<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>	
Concentración	A	M		A	M		A	M	
TA	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
0 %	25 ab	1 d	1 d	25 ab	1 d	1 d	25 a	1 a	1 a
20 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	25 a	0,75 cd	0,5 bc
40 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	25 a	0,5 bc	0,5 bc
60 %	25 ab	0,5 bc	0,25 ab	25 ab	0,5 b	2,5 de	75 a	3 e	3 e
GRAN ENANO (AAA)	<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>	
Concentración	A	M		A	M		A	M	
TA	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
0 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
20 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
40 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
60 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

FOC B	1 OBSERVACION			2da OBSERVACION			3era. OBSERVACION		
	<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>	
Concentración	A	M		A	M		A	M	
GROS MICHEL (AAA)									
TA	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
0 %	100 d	3,25 e	3 e	100 d	3,25 e	3 e	100 d	3,75 e	3,75 e
20 %	50 bc	1,75 d	1,53 d	50 bc	1,75 d	1,5 d	75 cd	2,51 e	2,25 e
40 %	0 a	0 a	0 a	25 ab	0,75 cd	0,5 bc	25 ab	0,75 cd	0,5 bc
60 %	25 ab	0,75 cd	0,5 bc	25 ab	0,75 cd	0,5 bc	25 ab	0,75 cd	0,5 bc
FHIA03 (AABB)	<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>	
Concentración	A	M		A	M		A	M	
TA	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
0 %	25 ab	1 a	1 a	50 bc	2 de	2 de	75 cd	2,5 e	2,25 e
20 %	25 ab	0,75 cd	0,75 cd	25 ab	0,75 cd	0,75 cd	50 bc	1,5 d	1,25 d
40 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	25 ab	0,75 cd	0,75 cd
60 %	50 bc	2 a	2 a	75 cd	3 e	3 e	75 cd	3 e	3 e
GRAN ENANO (AAA)	<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>		<u>Incidencia</u>	<u>Severidad</u>	
Concentración	A	M		A	M		A	M	
TA	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
0 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
20 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
40 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
60 %	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

C* = concentraciones de extracto crudo de FOC. Tratamientos (promedio de 4 repeticiones). Solo en los cultivares Gros Michel (AAA) y FHIA 03 (AABB) se presenta diferencia significativa (p > 0,05), aplicando prueba de Tukey. A= amarillamiento; M= marchitez.

Anexo 7. Efecto del aislado A y B de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (FOC), sobre la severidad interna del Mal de Panamá en tres cultivares de *Musa* en condiciones de Invernadero

FOC A	INCIDENCIA	DECOLORACION CORMO
GROS MICHEL (AAA)		
Concentración		
TA	0 a	0 a
0 %	100 d	2.75 e
20 %	50 bc	1.75 de
40 %	25 ab	1.25 de
60 %	25 ab	0.5 bc
FHIA03 (AABB)		
Concentración		
TA	0 a	0 a
0 %	25 ab	0.5 bc
20 %	25 ab	0.5 bc
40 %	25 ab	0.5 bc
60 %	75 cd	3.75 e
GRAN ENANO (AAA)		
Concentración		
TA	0 a	0 a
0 %	0 a	0 a
20 %	0 a	0 a
40 %	0 a	0 a
60 %	0 a	0 a
FOC B	INCIDENCIA	DECOLORACION CORMO
GROS MICHEL (AAA)		
Concentración		
TA	0 a	0 a
0 %	100 d	4.75e
20 %	75cd	3 e
40 %	75 cd	0.5 bc
60 %	25 ab	0.5 bc
FHIA03 (AABB)		
Concentración		
TA	0 a	0 a
0 %	75 cd	2.75 e
20 %	50 bc	1.5 de
40 %	25 ab	1 d
60 %	75 cd	3.75 e
GRAN ENANO (AAA)		
Concentración		
TA	0 a	0 a
0 %	0 a	0 a
20 %	0 a	0 a
40 %	0 a	0 a
60 %	0 a	0 a

C* = concentraciones (promedio de 4 repeticiones). Solo en los cultivares Gros Michel (AAA) y FHIA 03 (AABB) En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), aplicando prueba de Tukey.

Anexo 8. Análisis de Varianza de la brotación de microsecciones de cormo de tres variedades de banano, inoculados con extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (FOC).

FV	GL	SC	CM	F	Pr > F
CULTIVAR	2	79.7314	39.8657	53.75	< 0.0001
AISLADO	1	0.0046	00.0046	0.01	0.9371
CONCENTRACIÓN	5	38.1342	7.6268	10.28	< 0.0001
CULTIV.x AISLA.	2	0.7314	0.3657	0.49	0.6115
CULTIV. x CONC.	10	16.1018	1.6101	2.17	0.0215
AISL. x CONC.	5	1.2453	0.2490	0.34	0.8908
AIS.xCUL.xCONC.	10	4.1018	0.4101	0.55	0.8502
ERROR	180	133.50	07416		
TOTAL	215	273.55			

Valores > 0.05 (no hay diferencia significativa)

Valores < 0.05 (hay diferencia significativa)

Valores < 0.01 (hay diferencia altamente significativa)

Anexo 9. Análisis de Varianza de peso de raíces de vitroplantas de tres variedades d banano inoculadas con extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (FOC).

FV	GL	SC	CM	F	Pr > F
CULTIVAR	2	3.39	1.69	21.89	< 0.0001
AISLADO	1	0.51	0.51	6.66	0.0112
CONCENTRACIÓN	5	17.52	3.51	45.16	< 0.0001
CULTIV.x AISLA.	2	0.79	0.39	5.14	0.0074
CULTIV. x CONC.	10	13.66	1.36	17.60	< 0.0001
AISL. x CONC.	5	0.35	0.07	0.93	0.4676
AIS.xCUL.xCONC.	10	1.76	0.18	2.26	0.0191
ERROR	107	8.31	0.077		
TOTAL	142	46.33			

Valores > 0.05 (no hay diferencia significativa)

Valores < 0.05 (hay diferencia significativa)

Valores < 0.01 (hay diferencia altamente significativa)

Anexo 10. Análisis de Varianza de peso de hojas de vitroplantas de tres variedades d banano inoculadas con extracto crudo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC).

FV	GL	SC	CM	F	PR > F
CULTIVAR	2	55.92	27.96	73.57	< 0.0001
AISLADO	1	2.92	2.92	7.69	0.0065
CONCENTRACIÓN	5	51.00	10.20	26.84	< 0.0001
CULTV. X AISL.	2	0.19	0.09	0.25	0.7767
CULT. x CONC.	10	39.98	3.99	10.52	< 0.0001
AISL. x CONC.	5	2.49	0.49	1.31	0.2648
CUL.xAIS.xCONC	10	3.07	0.30	0.81	0.6205
ERROR	107	40.67	0.38		
TOTAL	142	196.25			

Valores > 0.05 (no hay diferencia significativa)

Valores < 0.05 (hay diferencia significativa)

Valores < 0.01 (hay diferencia altamente significativa)

Anexo 11. Análisis de Varianza de Marchitez de plántulas de tres variedades de banano inoculadas con suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC).

FV	GL	SC	CM	F	PR > F
CULTIVAR	2	14.600	7.3000	8.06	0.0006
AISLADO	1	7.5000	7.5000	8.28	0.0050
CONCENTRACIÓN	4	15.283	3.8208	4.22	0.0035
CULT. x AISL	2	5.0000	2.5000	2.76	0.0686
CULT. x CONCEN	8	19.066	2.3833	2.63	0.0123
AISL x CONCEN.	4	8.5833	2.1458	2.37	0.0584
CUL.xAIS.xCONC	8	12.166	1.5208	1.68	0.1142
ERROR	90	81.500	0.9055		
TOTAL	119	163.70			

Valores > 0.05 (no hay diferencia significativa)

Valores < 0.05 (hay diferencia significativa)

Valores < 0.01 (hay diferencia altamente significativa)

Anexo 12. Análisis de Varianza de amarillamiento de plántulas de tres variedades de banano, inoculadas con suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC).

FV	GL	SC	CM	F	PR > F
CULTIVAR	2	11.400	5.7000	2.81	0.0001 *
AISLADO	1	7.5000	7.5000	8.77	0.0035
CONCENTRACIÓN	4	13.133	3.2833	3.94	0.0054
CULT. x AISL	2	4.2000	2.1000	2.52	0.0861
CULT. x CONCEN	8	15.766	1.9708	2.36	0.0233
AISL x CONCEN.	4	7.0000	1.7500	2.10	0.0873
CUL.xAIS.xCONC	8	8.8000	1.1000	1.32	0.2438
ERROR	90	75.000	0.8300		
TOTAL	119	142.80			

Valores > 0.05 (no hay diferencia significativa)

Valores < 0.05 (hay diferencia significativa)

Valores < 0.01 (hay diferencia altamente significativa)

Anexo 13. Análisis de Varianza de Severidad Interna de plántulas de tres variedades de banano, inoculadas con suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC).

FV	GL	SC	CM	F	PR > F
CULTIVAR	2	2.05	1.0272	3.30	<0.0001*
AISLADO	1	1.00	1.0035	7.94	0.0059
CONCENTRACIÓN	4	2.05	0.5145	4.07	0.0043
CULT. x AISL	2	0.73	0.3630	2.87	0.0613
CULT. x CONCEN	8	2.57	0.3213	2.54	0.0147
AISL x CONCEN.	4	1.22	0.3155	2.42	0.0537
CUL.xAIS.xCONC	8	1.22	0.2135	1.80	0.0874
ERROR	90	10.67	0.1186		
TOTAL	119	22.023			

Valores > 0.05 (no hay diferencia significativa)

Valores < 0.05 (hay diferencia significativa)

Valores < 0.01 (hay diferencia altamente significativa)

Anexo 14. Análisis de Varianza de Incidencia de plántulas de tres variedades de banano, inoculadas con suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC).

FV	GL	SC	CM	F	Pr > F
CULTIVAR	2	1.6482	0.8241	2.85	< 0.0001
AISLADO	1	0.9813	0.9813	8.69	0.0041
CONCENTRACIÓN	4	1.7389	0.4347	3.85	0.0062
CULT. x AISL	2	0.5902	0.2951	2.61	0.0788
CULT. x CONCEN	8	2.0659	0.2582	2.29	0.0281
AISL x CONCEN.	4	1.0197	0.2549	2.26	0.0690
CUL.xAIS.xCONC	8	1.2756	0.1594	1.41	0.2021
ERROR	90	10.1606	0.1128		
TOTAL	119	19.480			

Valores > 0.05 (no hay diferencia significativa)

Valores < 0.05 (hay diferencia significativa)

Valores < 0.01 (hay diferencia altamente significativa)