

Universidad de Costa Rica  
Facultad de Ciencias Agroalimentarias  
Escuela de Agronomía

Identificación y patogenicidad de hongos asociados al deterioro radical en el cultivo de  
banano en la zona de Río Frío, Sarapiquí, Costa Rica.

Daniela Molina Salas

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO  
CON EL GRADO DE LICENCIATURA EN AGRONOMIA.

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2018

## Dedicatoria

A mi abuelito Alfonso y  
tío Eduardo quienes  
partieron durante este  
proceso, ejemplo de  
hombres trabajadores  
y perseverantes.

A todas las familias que  
reciben su sustento a  
través de la siembra del  
cultivo de banano.

A mi familia,  
los amo.

## Agradecimientos

En especial a mi directora de tesis Dra. María del Milagro Granados, a quien admiro como persona y profesional, gracias por toda la motivación, la paciencia, la ayuda, los consejos y su confianza durante este proceso.

Al Dr. Miguel Muñoz y a la Dra. Priscilla Chaverri por el enorme apoyo brindado, les agradezco sus consejos y guía, gracias a ustedes he crecido profesional y personalmente.

A todo el equipo de Research & Development perteneciente a Standard Fruit Company de Costa Rica S.A (DOLE), gracias por toda la colaboración y las facilidades brindadas durante mi participación con el departamento.

Al personal del Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC), por facilitarnos un espacio para el desarrollo del proyecto.

Al equipo del Laboratorio de Fitopatología (CIPROC) y al equipo de micología agrícola por toda su asistencia en el proyecto, especialmente a Pau, Adri, Alice, Dani y Gaby.

A la Dra. Melissa Mardones y al MSc. Efraín Escudero, por su valioso apoyo.

A mi familia y amigos, en especial a Andre, Marce, Fio y Eric de quienes recibí un apoyo incondicional. A los que me apoyaron de una u otra forma.

A mi Dios, por nunca soltarme.

A todos, ¡muchas gracias!

## Acta de Aprobación

Identificación y patogenicidad de hongos asociados al deterioro radical en el cultivo de banano en la zona de Río Frío, Sarapiquí, Costa Rica.

Daniela Molina Salas

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO  
CON EL GRADO DE LICENCIATURA EN AGRONOMIA

María del Milagro Granados Montero, Ph. D.

---

Directora de Tesis

Priscila Chaverri Echandi, Ph. D

---

Miembro asesor

Luis Felipe Arauz Cavallini, Ph. D.

---

Miembro asesor

Miguel Eduardo Muñoz Fonseca Ph. D

---

Miembro asesor

Luis Gómez Alpízar, Ph. D.

---

Director de la escuela

Daniela Molina Salas

---

Candidata

## Índice general

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos .....	ii
Acta de Aprobación .....	iii
Resumen .....	vi
Lista de Cuadros.....	vii
Lista de Figuras .....	viii
I. Introducción.....	1
A. Objetivo general .....	6
B. Objetivos específicos .....	6
II. Antecedentes .....	7
A. Generalidades botánicas de la planta de banano .....	7
1. Sistema Radical.....	8
2. Cormo.....	8
B. Principales hongos que afectan la raíz, el cormo y el pseudotallo en el cultivo de banano. ....	9
1. <i>Fusarium</i> .....	10
a) Ciclo de vida .....	11
b) Características morfológicas .....	12
c) Características moleculares .....	17
d) Biología y distribución geográfica .....	18
e) Hospederos .....	19
f) Patogenicidad.....	19
2. <i>Rhizoctonia</i> .....	22
a) Ciclo de vida .....	23
b) Características morfológicas .....	24
c) Concepto “fusión de hifas” o Anastomosis .....	25
d) Características moleculares .....	26
e) Biología y distribución geográfica .....	27
f) Hospederos .....	28
g) Patogenicidad.....	29
III. Materiales y Métodos .....	30

A) Identificación morfológica de cepas .....	30
1. Género <i>Fusarium</i> .....	30
2. Género <i>Rhizoctonia</i> .....	31
3. Mantenimiento de cepas.....	31
B) Identificación molecular.....	32
1. Extracción de ADN .....	32
2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
C) Producción de inóculo.....	33
D) Prueba de patogenicidad .....	34
1. Evaluación de síntomas.....	37
2. Aislamiento a partir de tejido .....	37
3. Identificación de organismos producto del aislamiento.....	38
4. Cultivos monospóricos.....	38
5. Extracción y secuenciación de ADN.....	38
I.V Resultados .....	39
A) Identificación morfológica de aislamientos.....	39
1. Coloración de la colonia .....	39
2. Características de estructuras .....	41
B) Identificación molecular.....	45
C) Elección de protocolo para multiplicación de inóculo.....	46
1. Etapa de producción de inóculo.....	48
D) Prueba de Patogenicidad.....	49
1. Porcentaje de síntomas presentados en los tratamientos.....	49
2. Organismos recuperados por tratamiento.....	53
3. Evaluación de incidencia de deterioro radicular.....	54
4. Corroboración de la identidad de los hongos recuperados de las pruebas de patogenicidad.....	55
V. Discusión.....	57
VI. Conclusiones.....	57
VII. Recomendaciones.....	67
VIII. Anexos .....	69
IX. Literatura consultada.....	71

## Resumen

En este estudio se trabajó con nueve cepas de hongos patógenos de suelo, previamente aisladas de raíces de banano (*Musa AAA*) “Gran Enano”, que presentaban deterioro radical en la zona de Río Frío. Se realizó una caracterización morfológica y molecular mediante ITS. Se identificaron como organismos asociados al complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (cuatro cepas), *Fusarium solani* (una cepa) y *Rhizoctonia solani* (tres cepas). Las especies identificadas fueron sometidas a pruebas de patogenicidad con plantas de banano (*Musa AAA*) “Gran Enano” de seis semanas en un vivero en la zona de Río Frío. La incidencia fue evaluada semanalmente durante ocho semanas. Se registró un 100% de incidencia en todos los tratamientos; una cepa de *Fusarium oxysporum* (cepa 7T) y *Rhizoctonia solani* (cepa 3T) alcanzaron una mortalidad de 80% y 95% respectivamente, mientras que, las plantas testigo permanecieron sanas. Los organismos recuperados del tejido dañado proveniente de las pruebas de patogenicidad coincidieron con las especies originalmente inoculadas, confirmando la patogenicidad para los organismos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* en plantas de banano (*Musa AAA*) “Gran Enano”.

## Lista de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Coloración de las colonias mantenidas por 7 días en medio de cultivo PDA a +/- 24°C en oscuridad .....	39
<b>Cuadro 2.</b> Tipo de micelio y tipo de conidios para las colonias mantenidas por 7 días en medio de cultivo PDA a +/-24°C en la oscuridad.....	41
<b>Cuadro 3.</b> Características morfométricas de macro y microconidios de las cepas mantenidas por 7 días en medio de cultivo CLA a +/-24C a la oscuridad. ....	43
<b>Cuadro 4.</b> Características morfométricas para el micelio de las cepas 2T, 3T y 11T, mantenidas por 7 días en medio de cultivo PDA a +/-24°C en oscuridad .....	44
<b>Cuadro 5.</b> Análisis de la región ITS de géneros aislados de raíces de banano en diferentes zonas bananeras en la región de Río Frío.....	46
<b>Cuadro 6.</b> Evaluación cualitativa del protocolo para la multiplicación de inóculo.....	47
<b>Cuadro 7.</b> Promedio de esporas inoculado en la etapa de producción de inóculo.....	48
<b>Cuadro 8.</b> Organismos obtenidos en las plantas, después de 8 semanas de inoculación en condiciones de vivero en Río Frío .....	53
<b>Cuadro 9.</b> Análisis del factor de elongación para los organismos recuperados de la prueba de patogenicidad provenientes de raíces de banano en la zona de Río Frío .....	55
<b>Cuadro 10.</b> Características morfométricas para el micelio de las cepas asociadas a <i>Rhizoctonia solani</i> (cepas 3T y 11T), mantenidas por 7 días en medio de cultivo PDA a +/-24°C en oscuridad .....	56



## Lista de Figuras

- Figura 1.** Precipitación acumulada y temperatura diaria registradas para la zona de Río Frío durante los meses de febrero, marzo y abril, período en el que se efectuó la prueba de patogenicidad en vivero ..... 36
- Figura 2.** Coloración de las colonias en medio de cultivo PDA. a) y b) cepa 1T, c) y d) cepa 4T, e) y f) cepa 8T, g) y h) cepa 2T, i) y j) cepa 3T, k) y h) cepa 5T, m) y n) cepa 7T, o) y p) cepa 9T, q) y r) cepa 11T a 4 días de crecimiento, s) y t) cepa 11T a 7 días de crecimiento ..... 40
- Figura 3.** Macroconidios producidos en cada una de las cepas identificadas como *Fusarium*. a) cepa 1T, b) cepa 4T, c) cepa 5T, d) cepa 7T, e) cepa 8T, f) cepa 9T, g) clamidosporas pertenecientes a la cepa 1T ..... 42
- Figura 4.** Presencia de esclerocios en cepa 3T. a) coloración del esclerocio en medio de PDA. b) morfología del micelio proveniente del esclerocio en lente de 100X .... 44
- Figura 5.** Vista de las hifas y sus núcleos de las cepas identificadas *Rhizoctonia*, teñidas con Fenosafranina al 0.1%. a) cepa 2T, b) cepa 3T, c) cepa 11T ..... 44
- Figura 6.** Producto de gel virtual obtenidos mediante el uso de imprimadores ITS ..... 45
- Figura 7.** Ejemplo de cromatograma para la región ITS del aislamiento de *Fusarium oxysporum* (cepa 5T), asociado al deterioro radical en banano ..... 45
- Figura 8.** Pruebas para la producción de inóculo en Erlenmeyers para metodología 3. a) matriz sin agua. b) matriz con agua agregada ..... 47
- Figura 9.** Inóculo utilizado para la prueba en la etapa de vivero. a) y b) medio de arroz quebrado cubierto con el desarrollo del hongo. c) medio de cebada cubierto con el desarrollo del hongo ..... 48
- Figura 10.** Porcentaje de plantas por tratamiento con presencia de síntoma después de 8 semanas de inoculación en condiciones de vivero en Río Frío ..... 50
- Figura 11.** Síntomas generales durante la prueba de patogenicidad en vivero, se observa marchitez y pérdidas de unidades a) *F. solani* cepa 1T, b) *F. oxysporum* cepa 4T, c) *F. oxysporum* cepa 5T, d) *R. solani* cepa 3T, e) *R. solani* cepa 11,T f) *F. oxysporum* cepa 7T, g) *F. oxysporum* cepa 8T, h) *F. oxysporum* cepa 9T, i) Testigo (al fondo) vs. *R. solani* cepa 3T (frente), j) Testigo o control sin inocular ..... 51
- Figura 12.** Síntomas generales obtenidos de la prueba de patogenicidad en vivero. a) Pérdida de raíces debido a la necrosis radical, b) Necrosis ascendente de la raíz hasta la zona del cormo, c) y d) Necrosis en la raíz con zona de avance

ascendente, e) Afectación del cormo. f) y g) Descortezamiento del tejido radical de forma ascendente. h) y j) Daño intercalar en la zona radical vivero ..... 52

**Figura 13.** Porcentaje de mortalidad para cada una de las cepas inoculadas al final de la etapa de vivero..... 54

**Figura 14.** Vista de las hifas de los organismos obtenidos luego de la prueba en vivero asociados a *Rhizoctonia solani*, teñidas con fenosafranina al 0.1%. a) cepa 3T, b) cepa 11T ..... 56

## I. Introducción

El banano es uno de los principales cultivos en Costa Rica. Su producción genera ingresos al país, fuentes de empleo en las zonas rurales, encadenamientos con la agroindustria y es un rubro fundamental de las exportaciones. En el año 2016 se exportaron alrededor de 121 millones de cajas con un peso promedio de 18,14 kg, siendo uno de los años de mayor auge a pesar de haber disminuido su área de producción a un total de 42.410 hectáreas (Corporación Bananera Nacional 2017).

Sin embargo, como todos los cultivos, el banano es amenazado por diferentes enfermedades, lo cual es reflejado en una disminución de la producción, pérdida de unidades productoras y de la calidad de fruta en casos muy severos. Las principales enfermedades en el país son atribuidas al hongo *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet), antes conocido con el nombre de *Mycosphaerella fijiensis* causante de la Sigatoka Negra y al nematodo barrenador de raíces *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. El nematodo se alimenta de los tejidos de la zona radical y expone el sitio al ingreso de otros organismos como hongos o bacterias (Soto 2014).

La principal amenaza en la producción bananera es la enfermedad llamada Marchitez por Fusarium, anteriormente, conocida como Mal de Panamá. Esta enfermedad es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. *cubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, conocido como FOC, el cual ocasiona pudrición radical y marchitez vascular. Se conocen cuatro razas de este patógeno, las cuales tienen capacidades diferentes para infectar los cultivares de banano. La raza 1 ataca a cultivares susceptibles de Gros Michel, los cuales tuvieron una gran afectación en los años

cincuenta; la raza 2 puede afectar al banano del subgrupo Bluggoe; la raza 3 es problemática en plantas del género *Heliconia* spp; mientras que, la raza 4 ataca las plantas de banano de los cultivares del subgrupo Cavendish (i.e., Enano Cavendish, Gran Enano y Williams) (CAB International 2018).

La raza 4 de FOC no está reportada como presente en el continente americano y es considerada una plaga cuarentenaria de muy alto riesgo, ya que podría generar daños muy severos en las áreas de producción nacionales, debido a que estas se encuentran cultivadas en gran mayoría por variedades del subgrupo Cavendish, que son completamente susceptibles al patógeno (Jones 2010).

Debido a la importancia del sistema radical en cualquier cultivo y las amenazas hacia éste, la investigación en banano en el país se ha dirigido a mitigar principalmente el daño por el nematodo *Radopholus similis*, el cual es capaz de afectar el sistema radical del cultivo. El nematodo es capaz de penetrar y de alimentarse de los tejidos jóvenes de la raíz, lo que provoca pudriciones como síntoma secundario debido al ingreso de otros organismos oportunistas (Perry y Moens 2006). Se ha reportado el hongo *Cylindrocarpon musae* (Booth & Stover), asociado a las lesiones causadas por el nematodo *Radopholus similis* en banano, el cual fue encontrado en lesiones de raíces y cormos en Honduras, Costa Rica, Panamá, Ecuador, Filipinas, Martinica y Guadalupe, comprendiendo hasta 50% de los aislamientos realizados en la investigación (Booth y Stover 1974).

Las búsquedas de diferentes alternativas para el combate de nematodos se enfocan en el uso de nematicidas sintéticos del tipo organofosforado y carbamatos, y alternativas como la incorporación de materia orgánica, y la implementación de

microorganismos al suelo, mediante la utilización de cepas benéficas de hongos como *Trichoderma* Pers.

Los hongos de suelo son de importancia en cualquier sistema biológico, inclusive en suelos destinados a la producción, debido a que colaboran en procesos de descomposición, por su capacidad de mineralización, reciclaje de nutrientes y su interacción con otros microorganismos. Sin embargo, también existen hongos de suelo que actúan como patógenos de plantas causando pérdidas en producción y rendimiento (Moreira *et al.* 2011). Esto es mucho más notable en sistemas de monocultivos extensivos como es el caso del cultivo del banano.

Según Arauz (2011), los hongos son el grupo de patógenos de mayor número, ya que, pueden afectar todas o varias partes de la planta, inclusive pueden variar su forma de reproducción según las condiciones, lo que aumenta la diversidad morfológica del hongo. Algunos de estos organismos como *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Aspergillus* P. Micheli ex Haller, y *Fusarium* Link, suelen atacar una gran variedad de cultivos.

Específicamente en banano, Pérez Vicente *et al.* (2002) realizaron estudios en Cuba con plantas en fase de endurecimiento que presentaban raíces necrosadas y cormos con pudrición, los resultados obtenidos de los aislamientos y postulados de Koch mostraron que los organismos generalmente asociados a estos daños fueron: *Fusarium oxysporum* (Schltdl.), *Fusarium equiseti* (Corda), *Fusarium incarnatum* (Desm) (antes *Fusarium semitectum* (Berk. & Ravenel), *Cylindrocarpon musae* (Booth & Stover), y *Rhizoctonia* D.C.

En Egipto, se llevaron a cabo pruebas con la inoculación de diferentes especies de *Fusarium* para conocer su asociación con la pudrición del corno del banano, entre las especies utilizadas para el ensayo se pueden mencionar: dos cepas de *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *F. fujikuroi* (Nirenberg) (sinónimos *F. subglutinans* (Wollenw & Reinking)), *F. moniliforme* (J. Sheld), *F. lateritium* (Nees), *F. solani* (Mart.) y una cepa de *Fusarium* sp. Entre las especies más dañinas se encontraron *F. lateritium* (Nees), *F. fujikuroi* y *F. oxysporum*, con 83, 72, y 67% de severidad en el corno, respectivamente (Ammar 2007).

Otro hongo que se menciona como agente causal de la pudrición de la raíz en el cultivo de banano es *Cylindrocladium* Morgan. Schadeck *et al.* sf. señalan que los suelos andisoles y vertisoles son suelos que favorecen la prolongación del inóculo en el suelo.

Sin embargo, no todos los organismos pueden ocasionar daños, algunos pueden brindar diferentes beneficios para la planta según su forma especial y cepa. Por ejemplo, Waweru *et al.* (2014) reportan a *F. oxysporum* como hongo endófito y controlador de nematodos en banano y observaron un aumento de rendimientos cuando se realizó la inoculación por su capacidad de suprimir a nematodos como *Pratylenchus goodeyi* (Sher y Allen) y a *Helicotylenchus multincinctus* (Cobb) Golden. Además Sikora *et al.* (2008), mostraron que cepas de *Fusarium oxysporum* endófito eran capaces de producir resistencia inducida, alterando los exudados de las raíces haciéndolas menos atractivas para los nematodos.

En Costa Rica, con el fin de conocer la micofauna asociada a raíces deterioradas de banano la empresa DOLE Standard Fruit Company de Costa Rica y el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Costa Rica (UCR), realizaron un muestreo preliminar

en diferentes sectores de las fincas en producción de la zona de Río Frío, Sarapiquí: siembras nuevas, áreas comerciales, zonas en barbecho, áreas con plantas caídas, áreas con diferentes tratamientos (sin herbicidas, sin nematicidas, con riego).

Los resultados de las muestras analizadas indicaron la presencia de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* D.C, *Cylindrocarpon* Wollenw, *Codinaea* Maire., *Penicillium* Link., *Pestalotia* De Not., y *Trichoderma* Pers. (Vargas 2016). Sin embargo, aún no se sabe si estos organismos están involucrados directamente con la pudrición observada en las raíces o si son hongos oportunistas, por lo que se realizó el siguiente estudio para determinar si son los agentes causales del deterioro radical de plantas de banano en la zona de Río Frío.

## A. Objetivo general

Identificar y determinar la patogenicidad en condiciones de vivero de los principales hongos asociados al deterioro radical en el cultivo de banano comercial var. Enano Ecuatoriano ubicados en la zona de Río Frío, Sarapiquí, Costa Rica.

## B. Objetivos específicos

1. Identificar a nivel de especie mediante técnicas convencionales y moleculares los nueve aislamientos previamente obtenidos a partir de tejido radical deteriorado en plantas de banano var. Enano Ecuatoriano provenientes de la zona de Río Frío, Sarapiquí, Costa Rica.
2. Determinar cuál es el mejor protocolo de inoculación y multiplicación para cada especie de hongo identificado previamente, para producir suficiente inóculo viable y desarrollar las pruebas de patogenicidad en vivero.
3. Determinar la patogenicidad de cada especie de hongo mediante los postulados de Koch en plántulas de banano var. Enano Ecuatoriano.



## II. Antecedentes

### A. Generalidades botánicas de la planta de banano

El banano (*Musa AAA*) es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia Musaceae (Trópicos 2018). De acuerdo con Soto (2014), es una planta herbácea, con un pseudotallo aéreo que se origina de un cormo carnoso, donde se lleva a cabo el desarrollo de las yemas laterales conocidos como “hijos”. Su filotaxia es espiral, esto quiere decir que su distribución es de forma helicoidal, su inflorescencia, generalmente llamada “chira” es terminal y crece a través del pseudotallo (falso tronco) para alcanzar la superficie por el centro de este.

Los bananos comestibles utilizados actualmente son estériles, resultado de una hibridación entre sus antecesores silvestres la especie *Musa acuminata* Colla (genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (genoma B) (Ortiz y Swennen 2014, (Tropicos.org 2018)(Tropicos.org 2018)Tropicos.org 2018).

A partir de esto, ha sido clasificado en nueve grupos de cultivares, los cuales poseen diferencias en los niveles de ploídia y aportes en el genoma, desde diploides ( $2n$ ) a tetraploides ( $4n$ ). El cultivo se propaga por técnicas *in vitro* de forma asexual, por lo que cada planta es similar a su madre. En Costa Rica los cultivares de mayor importancia comercial son triploides ( $3n$ ) y pertenecen al grupo AAA, entre los que se pueden mencionar: “Gros Michel” base del comercio bananero hasta los años 1950, variedades del subgrupo Cavendish, que es un grupo de plantas variantes de menor porte, entre las que destaca “Dwarf Cavendish” y “Giant Cavendish” o “Gran Enano”, este último ha desplazado en el país a otras variedades en plantaciones comerciales como a “Valery” y a “Dwarf Cavendish” (Soto 2014).

## 1. Sistema Radical

Después de la germinación a partir de la semilla, la raíz primaria es sustituida por un sistema de raíces adventicias, estos crecen en grupos de tres o cuatro y pueden tener un diámetro de 5 a 10 mm, la longitud varía según el cultivar (Simmonds 1960, Sandoval y Muller 1999).

El sistema radical es poco profundo, varios autores Simmonds (1960), Sandoval y Muller (1999), Turner y Rosales (2005), así como Soto (2014), coinciden en que la profundidad alcanzada por las raíces ronda entre los 20 - 30 cm del suelo. Beugnon y Champion (1966) citado por Soto (2014), indicaron que la raíz puede crecer alrededor de 2 a 3,5 cm/día.

Para el cultivar “Gran Enano”, Soto (2014) observó que el 60 – 70% de las raíces se encuentran en los primeros 30 cm de profundidad y con una distancia horizontal de 0 a 90 cm desde la base de la planta, en la zona de Guápiles en Costa Rica.

## 2. Cormo

El cormo es una zona bulbosa, erecta y gruesa con entrenudos vestigiales, y con crecimiento monopódico (Simmonds 1960). Su principal función es ser un órgano de almacenamiento o reserva, formado por la raíz y el pseudotallo o vástago; y comprende dos zonas importantes, la zona cortical o externa que sirve de protección y la zona del cilindro central donde emergen las raíces (Sandoval y Muller 1999).

La parte superior está cubierta con hojas, las cuales, forman un anillo completo, lo que hace que luzca como un tronco, no obstante, son varias hojas superpuestas a

generando un pseudotallo (Cortés 1994). Según Simmonds (1960), en la depresión cerca de las bases foliares se encuentra el meristema apical.

Skutch, citado por Simmonds (1960), así como, Sandoval y Muller (1999), distinguieron cuatro tipos de haces vasculares en el cormo, en los que se describe su relación de conducción desde diferentes zonas de la planta hasta la zona del cilindro central, este sistema de haces es el responsable del movimiento de la savia y nutrimentos.

Los entrenudos son muy cortos, por lo que su altura es relativamente poca, estos pueden crecer en un diámetro de 25 - 40 cm con un peso entre 6,9 - 11,5 kg (Sandoval y Muller 1999). Por ejemplo, un cultivar como el Gros Michel, su cormo maduro puede alcanzar 30 cm de ancho en la parte superior, de acuerdo con Simmonds (1960).

## B. Principales hongos que afectan la raíz, el cormo y el pseudotallo en el cultivo de banano.

Entre las enfermedades radicales y sus agentes causales registrados para banano se pueden mencionar: la necrosis del cormo por *Armillaria* (Fr.) Staude, la pudrición radical del cormo y raíz por *Rosellinia* De Not., la pudrición radical y cormo por *Fusarium compactum* (Wollenw.) Raillo y por *Fusarium oxysporum*, la pudrición radical por *Cylindrocladium* Morgan, y la pudrición del pseudotallo causada por *Deightoniella* S. Hughes.

Gran cantidad de hongos pueden valerse de otros organismos para obtener un beneficio propio, un ejemplo de esto es *Cylindrocarpon musae* el cual utiliza las heridas realizadas por el nematodo *Radopholus similis* para ingresar e infectar la planta. El

nematodo barrenador *R. similis* es considerado uno de los organismos que genera mayor problema en la zona radical de la planta de banano (Ploetz 2010), además, Pérez *et al.* (2008) informaron de necrosis radical y de cormo provocada por el hongo *Rhizoctonia fragariae* (Husain & McKeen), a nivel de plantas in vitro.

Sin embargo, entre las enfermedades fúngicas de suelo más importantes es la Marchitez por *Fusarium*, también llamada Mal de Panamá o Fusariosis causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hansen. Esta se considera como una de las enfermedades más agresivas, debido a que infecta los haces vasculares de la planta, lo que genera una pudrición interna, esto conlleva a marchitez en la parte aérea y finalmente al colapso a nivel del pseudotallo. Este organismo se clasifica fitopatológicamente como f. sp. (*forma specialis*), esto quiere decir que daña únicamente un grupo de plantas en específico, ya que posee características fisiológicas que lo permiten, en este caso, ataca únicamente a plantas de familia de las Musáceas y las Heliconias, géneros como *Musa* L. y *Heliconia* L.

A pesar de poseer esta característica de forma especial su identificación morfológica es vana ya que no hay forma de distinguirlo de otras formas especiales para *Fusarium oxysporum*, por lo que es necesario el uso de técnicas de biología molecular para su identificación (CAB International 2018).

### 1. *Fusarium*

*Fusarium* es uno de los microorganismos más importantes a nivel mundial, muchas de sus especies son patógenos de animales, plantas y humanos. Este género de hongo está distribuido alrededor del mundo, habita desde zonas tropicales a zonas templadas

incluyendo temperaturas extremas como en el desierto y en áreas árticas. Son residentes del suelo, pero pueden habitar en partes aéreas en plantas u otros sustratos. El género representa uno de los hongos más estudiados por presentar producción de micotoxinas (metabolitos secundarios) los cuales son un peligro para la salud humana y animal (Nelson *et al.* 1994).

Sin embargo, estos hongos filamentosos poseen una mayor importancia para la agricultura, ya que diferentes especies del género son los causantes de múltiples enfermedades en los agroecosistemas, lo que se traduce en pérdidas en la producción y grandes pérdidas económicas (Ma *et al.* 2013).

Según el Index Fungorum (2018) y Mycobank (2018) el género *Fusarium* sp. se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma:

Reino: Fungi.

Filo: Ascomycota.

Subfilo: Pezizomycotina.

Clase: Sordariomycetes.

Subclase: Hypocreomycetidae.

Orden: Hypocreales.

Familia: Nectriaceae.

#### a) Ciclo de vida

El ciclo de vida de este género es amplio, y este puede variar según la especie y el hospedero. Es un hongo que posee dos formas de reproducción, asexual (anamorfa)

y sexual (teleomorfa), en algunos casos se les puede encontrar en cualquiera de ellas, sin embargo, su forma más habitual es la asexual. Esta inicia con la germinación de una espora asexual llamada conidio o de una clamidospora, estructura de resistencia de micelio endurecido que pueden permanecer en el suelo por muchos años, aún en ausencia de condiciones para su germinación (Ploetz 1993).

Una vez que las condiciones son las adecuadas la espora germina y emite hifas hasta formar un micelio, luego surgen estructuras simples llamadas conidióforos o agregaciones de los mismos llamados esporodoquios, de aquí vuelven a surgir conidios, los cuales se clasifican según su número de septos y su longitud, en microconidios y macroconidios (Ma *et al.* 2013).

Su fase sexual puede ser nombrada de múltiples formas, ya que varía según la especie y el hospedero. En esta fase es necesaria la convergencia de talos opuestos provocando una unión que por medio de plasmogamia resulta en una hifa con dos núcleos (dicariótica) y esta seguirá dividiéndose por mitosis (Ma *et al.* 2013). Este estado forma cuerpos fructíferos llamados peritecios, los cuales suelen ser de coloración llamativa rojizos o naranjas como así también de coloraciones negras o azules. Las ascosporas (esporas sexuales) se encuentran dentro del peritecio en paquetes o sacos llamados ascas, las cuales se rompen y expulsan las ascosporas por la cavidad del peritecio llamada ostiolo (Schmale III y Bergstrom 2003).

#### b) Características morfológicas

Los sistemas de identificación para el género *Fusarium* propuestos han sido numerosos. Desde el emitido por Wollenweber y Reinking en 1935, se han creado diez

sistemas, sin embargo, el más utilizado es de los autores Snyder y Hansen publicado en 1940, el cual se basó esencialmente en la morfología del macroconidio y en la naturaleza y variabilidad de las especies (Ploetz 1993).

Los diferentes sistemas de identificación generalmente utilizan características macro y micro morfológicas para describir el organismo, de esta manera son agrupados en diferentes secciones. Entre las características macromorfológicas se pueden nombrar: la coloración de la colonia en medio de cultivo en medio Potato Dextrose Agar (PDA), mientras que, las características micromorfológicas incluyen: tipo de fiálides (longitud y polimorfismo: monofiálides o polifiálides), presencia o ausencia de microconidios, forma de los conidios (macro y micro) y forma de las células basales y apicales ubicados a los extremos del macroconidio, número de septos del macroconidio, medidas de ancho y largo, presencia o ausencia de clamidosporas, formación en cadenas o solitarias, formación intercalar (crecimiento en medio de la hifa) o terminales, de textura rugosa o lisas.

De acuerdo con Leslie y Summerell (2007) *Fusarium oxysporum* es uno de los organismos más importantes en la agricultura, debido a que es causante de varias enfermedades vasculares y radicales en numerosos hospederos y es muy común encontrarlo en diferentes tipos de suelo.

El autor Booth (1971) en su libro *The Genus Fusarium* describe a esta especie como una de las más importantes económicamente, incluso una de las más cambiantes o variables. El mismo autor describe los aislamientos con un micelio de coloración blanca o durazno, pero siempre con tonos violáceos o púrpuras, de escaso a abundante micelio. Los microconidios por lo general son abundantes y de forma variable (ovalados o

cilíndricos) rectos o levemente curvados, con medidas de 5 – 12 x 2,2 – 3,5  $\mu\text{m}$ , estos provienen de fiálides simples, cortas y escasamente ramificadas. Los macroconidios son limitados en algunas cepas por lo que suelen verse muy poco; estos son delgados y en forma de bote, su célula apical es cónica y curvada, algunas veces con un pequeño gancho, su célula basal es punteada con forma de “pie”. Sus medidas dependen del número de septos: tres septos: 27 - 46 x 3 – 5  $\mu\text{m}$ , cinco septos: 35 – 60 x 3 – 5  $\mu\text{m}$ , seis a siete septos: 50 – 66 x 3.5 – 5  $\mu\text{m}$ , de los cuales, los macroconidios de 3 septos son los más comunes. Las clamidosporas se les encuentra rugosas y lisas, terminales o intercalares y de forma solitarias, no obstante, se les puede encontrar en cadenas o en pares.

Leslie y Summerell (2007) dividen las características del hongo según el medio de cultivo en el que se encuentren, debido a que, PDA es uno de los más utilizados se parte de este, además del medio Carnation Leaf Agar (CLA) otro medio de estudio que favorece el crecimiento de especies de *Fusarium*.

Los autores señalan que en el medio CLA la formación de esporodoquios comúnmente posee tonos naranjas pálido, se generan tres tipos de esporas: macroconidios cortos a medianos, con tres septos regularmente, formados o desarrollados en monofiálides que brotan sobre la hifa; microconidios ovalados, elípticos o reniformes normalmente sin septos, y clamidosporas, que se encuentran en abundancia. Su formación se obtiene entre las 2 o 4 semanas de realizado el aislamiento. Para el medio de PDA, Leslie y Summerell (2007), describen una variación cromática de la colonia, por lo que los tonos pueden ser de blanco a violeta, amarillo pálido, naranja pálido hasta café oscuro o puede no tener pigmentación.



En medio de cultivo PDA, pueden presentarse esporodocios de coloración naranja pálida, pero a pesar de esto no en todos los aislamientos se producen o son poco frecuentes. Los macroconidios poseen una célula apical, cónica y curvada y una célula basal, punteada o en forma de “pie”. Los aislamientos de *Fusarium oxysporum* suelen confundirse con otras especies, por ejemplo, *Fusarium subglutinans* y *Fusarium solani*. En este caso se opta por identificaciones basadas en técnicas moleculares (Leslie y Summerell 2007).

Por otro lado, *Fusarium solani* (Marti.) Sacc. ha sido encontrado en la mayor parte del mundo, y en variedad de ambientes. Es habitante de los suelos, generalmente en sitios de bosque lluvioso; no obstante, se puede encontrar en un sinnúmero de especies de plantas (Leslie y Summerell 2007).

*Fusarium solani* es capaz de causar pudrición radical, así como corchosis, además se reporta como organismo secundario en infecciones causadas por otros organismos. Entre ellos se puede mencionar: *Pythium Pringsh*, *Phytophthora* de Bary, *Botryosphaeria* Ces & De Not, *Macrophomina* Petr., *Rhizoctonia* D.C., e inclusive otras especies de *Fusarium*. Se ha registrado también la relación con nematodos fitopatógenos como lo es *Radopholus similis* en banano y *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb) (Booth 1971).

En medio de cultivo, *Fusarium solani* suele confundirse con *Fusarium oxysporum*, aunque difieren morfológicamente *F. solani* posee un micelio escaso a abundante micelio, con tonos de blanco a grises, con algunas pigmentaciones cafés. Los microconidios se encuentran en abundancia después de 2 a 3 días en condiciones de laboratorio, estos, poseen forma ovalada y pueden tener un septo, sus medidas se encuentran entre los 8 – 16 x 2,5 – 3  $\mu\text{m}$ . Los microconidios se desarrollan en fiálides largas (característica

importante para diferenciar de la especie *Fusarium oxysporum*), escasamente ramificadas, las cuales, terminan en una célula conidiógena; sus medidas son entre 45 – 80  $\mu\text{m}$  x 2,5 – 3  $\mu\text{m}$ . Los macroconidios son anchos, pueden ser rectos o levemente curvados; su célula apical suele ser redondeadas, su célula basal puede ser similar a la forma de “un pie”, redondeada, recta, casi cilíndrica; por lo que suele confundirse también con el género *Cylindrocarpon* (Wollenw.). Desarrollan de 5 a 7 septos, sus proporciones pueden variar según la cepa, 35 – 100  $\mu\text{m}$  x 4,5 – 8  $\mu\text{m}$ . Las clamidosporas tienden a desarrollarse en medios de cultivos pobres (pocos nutrientes) en un lapso de 7 – 14 días, de forma globosa, lisas o rugosas, intercalares o terminales y ocasionalmente pueden formar cadenas (Booth 1971).

En medio CLA, *Fusarium solani* tiende a producir macroconidios anchos y rectos o levemente curvados, con tres a siete septos con puntas redondeadas provenientes de esporodoquios con coloraciones amarillo pálido, o menos habitual en azul y verde. Los microconidios ovalados, elípticos o reniformes, con ninguno o solo un septo formados en largas fiálides. Las clamidosporas suelen encontrarse en parejas (Leslie y Summerell 2007).

En cultivo de PDA, los aislamientos usualmente poseen coloraciones blancas, crema, y micelio escaso. Los esporodoquios poseen coloraciones crema, azul o verdes. Sin embargo, algunos aislamientos pueden no producir pigmentación o pueden poseer tonos violetas a cafés.

Leslie y Summerell (2007) indican que la temperatura de crecimiento varía según la especie, cepa y condiciones ambientales. Ellos utilizaron dos temperaturas (25 y 30

°C) para medir el rango de crecimiento en medio de cultivo PDA, obteniendo entre 25 - 40 mm en ambas temperaturas después de tres días en completa oscuridad.

### c) Características moleculares

Por lo general la identificación de hongos filamentosos ha sido mediante técnicas de laboratorio por su expresión fisiológica, morfológica y por pruebas bioquímicas, sin embargo, debido a la necesidad de contar con un método preciso, se han establecido algunas herramientas para el análisis del ADN genómico, ribosomal y mitocondrial, las cuales pueden variar según el objetivo y la técnica. Entre los marcadores moleculares que se utilizan para el estudio de hongos se encuentran:  $\beta$ -tubulina (*tub2*), factor de elongación (*tef-1 $\alpha$* ), Histona- H3, o sectores de la zona nuclear o mitocondrial, siendo la región de codificación de ARN ribosomal la más utilizada (Leslie y Summerell 2007).

Cada uno de ellos tiene un propósito diferente; marcadores genéticos como ITS (Internal Transcribed Spacer), se identifica como “*el código de barras*” para estos organismos. Las regiones espaciadoras intergénicas del ADN ribosomal (rDNA) y el gen *tef-1 $\alpha$*  son utilizados para resolver relaciones evolutivas en especies de *Fusarium*. Además, la prueba de RFLP (Restriction Length Polymorphism), se utiliza para la diferenciación de *Fusarium* a nivel de especie e identificar la variabilidad genética dentro de poblaciones y el gen *tef-1 $\alpha$*  y las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina se han utilizado para analizar la filogenia en hongos, todos mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Dubey *et al.* 2014).

#### d) Biología y distribución geográfica

Los organismos del género *Fusarium* han sido reportados en casi todo el mundo, en su mayoría como organismo saprófito en el suelo, transportado por el aire o siendo un organismo endófito o patogénico de un rango amplio de plantas (Summerell *et al.* 2003).

*Fusarium oxysporum* es la especie que se encuentra más distribuida en todo el mundo. Se le puede encontrar en la mayoría de los suelos, desde las zonas árticas hasta en el desierto, inclusive ha sido recuperado de algas marinas, y se le cataloga como la especie más importante de *Fusarium* por la gran cantidad de hospederos y las pérdidas económicas en producción alimentaria. Es agente causal de muchas enfermedades vasculares, ya que bloquea el xilema vascular, y evita el paso constante de asimilados (Leslie y Summerell 2007). Esta especie presenta formas especiales designadas según el hospedero, que a su vez pueden presentar razas, variando su patogenicidad y agresividad (Booth 1971).

La especie *Fusarium solani* es patógeno de numerosas especies de plantas, algunas de mucha importancia económica. Según Leslie y Summerell (2007), la germinación de esporas de *Fusarium solani* es estimulada por aldehídos, algunos ácidos grasos y flavonoides, mientras que los macroconidios podrían necesitar etanol o serina para germinar, esto varía según la naturaleza del lugar. Además, los autores explican que la formación de clamidosporas podría verse afectada por el contenido lipídico de los macroconidios, pero esto no impacta su permanencia en el campo.

Sin embargo, por otro lado, *Fusarium solani* es capaz de ser agente biocontrolador como organismo micoparásito en hongos fitopatógenos como *Phomopsis sclerotioides*

Kesteren y *Mucor plumbeus* Bonord, específicamente en plantas del género *Euphorbia* L., siendo más efectivo que otros organismos usualmente utilizados en biocontrol (Leslie y Summerell 2007).

Booth (1971), resalta su relación con otros organismos produciendo un efecto sinérgico en relación con su patogenicidad, estos incluyen nematodos y algunos hongos que dañan la zona vascular.

#### e) Hospederos

El Index Fungorum (2018), registra 201 formas especiales (f. sp.) de *Fusarium oxysporum*; igualmente la base de datos de Mycobank (2018), reconoce 50 formas para la misma especie. Por otro lado, el Index Fungorum (2018), reporta 49 formas especiales para *Fusarium solani*, mientras que la base de datos del Mycobank (2018), enlista 48 formas especiales para el mismo organismo.

De acuerdo con Farr y Rossman (2018) y la base de datos del Agricultural Research Service de la USDA (2018), se encuentran alrededor de 1679 registros de plantas como hospederos para el hongo *Fusarium oxysporum* y 1147 para *Fusarium solani* en todas partes del mundo. Entre ellas se pueden mencionar: *Allium cepa* L., *Brassica oleracea* L. var. *capitata*, *Coffea arabica* L. , *Cucumis melo* L., *Glycine max* L. Merr., *Ipomoea batatas* L. Lam , *Musa* L., *Oryza sativa* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Solanum lycopersicum* L., *Solanum tuberosum* L., *Theobroma cacao* L., *Vigna Savi.*, *Zea mays* L.

#### f) Patogenicidad

Según Ma *et al.* (2013), los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que no son esenciales para el crecimiento regular, pero al mismo

tiempo representan una ventaja para algunos organismos. Algunos son pigmentos, otros son tóxicos para plantas o animales, intervienen en el crecimiento de la planta o los hay inclusive con propiedades farmacéuticas, como antibióticos.

Como género puede producir alrededor de 40 familias estructuralmente distintas de metabolitos secundarios como, fumonisinas y tricotecenos. En algunas especies se puede producir variedad de metabolitos secundarios, mientras que, en otras especies esta producción es muy limitada; así los genes que codifican para fusarina se encuentran en la mayoría del género *Fusarium* más no en *Fusarium oxysporum*.

Según Leslie y Summerell (2007), *Fusarium oxysporum* posee capacidades de producir enzimas degradadoras de la pared celular, entre las más comunes se pueden citar: celulasas, glucanasas, glucosidasas, pectinasas, poligalacturonidasas, xilanasas. Inclusive algunas cepas de *Fusarium oxysporum* puede metabolizar numerosos azúcares y una variedad de compuestos aromáticos entre ellos glicerol y penicilina V y algunas cepas son capaces de solubilizar lignina. Los autores resaltan la capacidad de este organismo para degradar las mismas defensas producidas por la planta en la interacción hospedero-patógeno.

En general los genes que intervienen en la patogenicidad participan en eventos como: la unión de esporas, la germinación, infección y colonización del hospedero, mediante formación de estructuras de infección, degradación de la pared celular, biosíntesis de toxinas y señalización. (Sutherland *et al.* 2013).

*Fusarium oxysporum* posee enzimas degradantes de las paredes celulares, así como enzimas específicas encontradas en formas especiales para la especie. Por

ejemplo, la enzima tomatinasa se ha identificado en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc) W.C. Snyder & H.N. Hansen, conocido como FOL (Sutherland *et al.* 2013). Después de la publicación se descubrieron otros genes relacionados con la patogenicidad llamados *Secreted in Xylem* (SIX), que son proteínas efectoras producidas por FOL durante la colonización del tomate e involucradas en la virulencia. Hasta el momento se han identificado 14 genes SIX en FOL, pero también se han identificado homólogos en otras formas especiales de *Fusarium oxysporum* entre ellas: *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (G.F. Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, *F. oxysporum* f. sp. *betae* (D. Stewart) W.C. Snyder & H.N. Hansen, *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* Mercier & Louvet, *F. oxysporum* f. sp. *lini* (Bolley) W.C. Snyder & H.N. Hansen e inclusive en *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hansen (Taylor *et al.* 2016).

Otros autores han investigado la efectividad de estos genes efectores SIX. En una cepa de *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* causante de pudrición de tallo y raíces en pepino, demostraron la contribución de SIX6 a la virulencia, realizando la transferencia de este gen a una cepa no patogénica y observando la pérdida de la virulencia a las cepas que perdieron el cromosoma que contiene los genes SIX (Dam *et al.* 2017).

Por otra parte, numerosas enzimas son producidas por *Fusarium solani* entre ellas, quitosanasas, esterases, levoglucosan-quinasa, lipasa, serina-proteasa, poligalacturonasas. No obstante, la cutinasa es una de las más importantes por tener una posición importante en la patogenicidad del organismo. Esta enzima participa de la degradación de varias fitoalexinas, y esto le da una ventaja al organismo sobre su hospedero (Leslie y Summerell 2007), también, se ha reportado la capacidad de

*Fusarium solani* de degradar lignina, importante en la pared celular de algunas plantas vasculares (Saparrat *et al.* 2000).

Dutta *et al.* (2018), describen la capacidad de producir celulosa por parte de organismos del género *Fusarium*, entre los cuales se menciona la especie *Fusarium solani* y su importancia en producción de bioetanol en la degradación de las paredes celulares de las plantas.

## 2. *Rhizoctonia*

Individuos del género *Rhizoctonia* se pueden localizar en todo el mundo como habitante de suelos y de plantas. Este organismo es uno de los más estudiados, importante como organismo patogénico, tanto en plantas cultivadas como en plantas silvestres. Presenta diferencias en patogenicidad y morfología, dificultando una identificación certera, por lo que se introdujo el concepto de anastomosis creando grupos intraespecíficos (Ogoshi 1987).

Algunos señalan la dificultad de su identificación por representar un complejo de especies que no se han definido, ya que se conoce muy poco de la ecología del mismo e incluso en algunas especies su forma sexual es pocas veces observable (Cubeta y Vilgalys 1997).



Según el Index Fungorum (2018) y Mycobank (2018) el género *Rhizoctonia* sp. se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma:

Reino: Fungi.

Filo: Basidiomycota.

Subfilo: Agaricomycotina.

Clase: Agaricomycetes.

Subclase: *Incertae sedis*.

Orden: Cantharellales.

Familia: Ceratobasidiaceae.

#### a) Ciclo de vida

Las especies de *Rhizoctonia* se pueden encontrar como organismos saprófitos, manteniéndose por periodos extensos sin un hospedero, sobreviviendo de la materia orgánica en el suelo. De igual forma, cuando las condiciones no son favorables producen estructuras de resistencia o supervivencia llamadas esclerocios, las cuales están formadas de micelio endurecido y pueden mantenerse en el suelo por años (Tredway y Burpee 2001).

Según Ajayi-Oyetunde y Bradley (2018), el ciclo de *Rhizoctonia* comienza con la etapa asexual con la división nuclear en las hifas vegetativas. Esta división se produce dentro de cada célula y ocurre de forma sincronizada en todas las células, lo que genera la duplicación de células hijas, la mitad de estas emigra hacia el sector nuevo en crecimiento de la hifa creando una división con la formación de un septo. En esta etapa no hay una producción de esporas como tal, sino más bien una producción de hifas

vegetativas o esclerocios, los cuales pueden germinar en condiciones adecuadas simulando una espora.

La etapa sexual comienza con la unión de núcleos genéticamente compatibles ubicados en las células vegetativas. De este emparejamiento se deriva la formación de basidios y posteriormente los núcleos unidos dentro de cada basidio sufren de cariogamia (fusión de núcleos sexuales) lo que resulta en núcleos diploides que eventualmente, por medio de meiosis se convertirán en cuatro células haploides que madurarán en basidiósporas (Ajayi-Oyetunde y Bradley 2018).

#### b) Características morfológicas

*Rhizoctonia solani* Kühn, es una de las especies más estudiadas y es considerado un organismo fitopatógeno muy destructivo con una amplia gama de hospederos alrededor del mundo. Es agente causal de muchas enfermedades en plántulas, semillas, zona vascular, raíces e inclusive en área foliar tanto en plantas para la producción alimentaria como en forestales u ornamentales (González *et al.* 2006).

Debido a que la forma asexual suele ser la que comúnmente se encuentra, la descripción morfológica de este género está basada generalmente en este morfo. De acuerdo con Carling y Summer (1992), las características más importantes para identificar morfológicamente a la especie son la pigmentación del micelio café o café oscuro, ramificación cerca del septo distal de las células en las hifas más jóvenes, formación de un septo en la misma rama cerca del punto de origen, estrangulamiento o estrechez de la hifa en el punto de origen, ausencia de conidios y en algunos casos producción de esclerocios. Mediante pruebas con coloración se puede determinar

número de núcleos en la hifa generalmente multinucleado y la clasificación por grupo de anastomosis.

c) Concepto “fusión de hifas” o Anastomosis

Según Carlile *et al.* (2001), la anastomosis se define como la fusión de hifas entre cepas diferentes genéticamente o incluso colonias, esto promueve el intercambio de material genético y fomenta la producción de cuerpos fructíferos y esclerocios.

*Rhizoctonia* es un género en el cual se han generado diferentes grupos de anastomosis, distribuyendo los aislamientos o cepas a partir de su unión con otras hifas, con la finalidad de identificar especies (Sneh *et al.* 1991).

Se describen tres tipos de fusión de hifa: fusión perfecta, fusión imperfecta y fusión por contacto. La fusión perfecta incluye una fusión de las paredes celulares y citoplasma; la fusión imperfecta ocurre, generalmente, entre cepas de diferentes aislamientos y a pesar de que resulta en una plasmólisis se ha demostrado que hay un intercambio de material genético; la fusión por contacto no suele ser considerada un tipo de anastomosis, ya que, hay un contacto entre las hifas de las cepas involucradas mas no existe una lisis de la membrana, por lo que no hay ningún tipo de intercambio genético (Sneh *et al.* 1991).

Se han descrito un total de 13 grupos de anastomosis para *Rhizoctonia solani*, en los grupos AG1, AG21, AG2 2 y AG4 se ubican los organismos que producen daños vasculares y pudriciones en semillas en algunos cultivos (Kiliçoğlu y Özkoç 2010).

#### d) Características moleculares

La identificación de *Rhizoctonia solani* de forma morfológica o por medio de las pruebas de anastomosis aún siguen siendo válidas; no obstante, algunas cepas pueden perder su capacidad de anastomosis con el tiempo, esto es debido a que la expresión de las cepas en medios de cultivos puede limitarse según su almacenamiento y condiciones, que conduce a una identificación errónea del organismo. En consecuencia se han establecido métodos moleculares para efectuar un reconocimiento certero del género, y la especie (Kiliçoğlu y Özkoç 2010).

La función de la biología molecular en taxonomía es caracterizar el grado de similitud o de variabilidad de las bases o la repetición de motivos en las regiones del ADN que se han mantenido a través de la evolución. Mediante técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), se pueden distribuir los aislamientos en los diferentes grupos anastomosis (Lübeck y Poulsen 2001).

Según Kiliçoğlu y Özkoç (2010), los genes del ARNr nuclear fúngico se encuentran en repeticiones de varios cientos de copias por genomas. En cada unidad se encuentran tres genes importantes de ARNr (18s), el gen ARNr (5.8S) y un gen de la subunidad grande (28S). Las secuencias conservadas se encuentran en estas subunidades, mientras las regiones de ITS se ubican entre las subunidades.

Guillemaut *et al.* (2003) señalan como el polimorfismo entre los grupos AG fue revelado en las secuencias de los genes antes mencionados y también como los estudios en la región ITS definió la importancia para diferenciar entre grupos de AG y subgrupos.

#### e) Biología y distribución geográfica

A pesar de que *Rhizoctonia solani* ha sido descrito como un hongo habitante del suelo, Ajayi-Oyetunde y Bradley (2018), lo describen como un parasito facultativo muy exitosos para competir con otros organismos saprófitos en el suelo, debido a una de sus formas de propagación, los esclerocios. Estos, al ser favorecidos por condiciones específicas, germinan para formar micelio, que se genera en respuesta a los exudados emitidos por la planta, de tal forma que el organismo rodea las paredes de su huésped y mediante la formación de apresorios atraviesa tejido hasta establecerse y propicia un eventual colapso vascular. También, se le considera necrotrófico, ya que mata su hospedero antes de la colonización, esto asociado a la producción de enzimas o toxinas.

Según Carling y Summer (1992) la distribución de *Rhizoctonia solani* es amplia y se encuentra por todo el mundo, al mismo tiempo su distribución ha sido clasificada por los diferentes grupos de anastomosis:

- AG-1: su ubicación es globalizada y se ha aislado de muchos hospederos y proveniente del suelo.
- AG-2: encontrado de igual forma en todas partes del mundo.
- AG-3: conocidos por ser tolerantes a temperaturas frías o bajas más que otros grupos de AG, encontrado especialmente donde se da la producción de papa (*Solanum tuberosum* L.).
- AG-4: distribuido alrededor del mundo.
- AG-5: localizado en Europa, Asia y Norteamérica.
- AG-6, AG-BI (“bridging isolate”).

- AG-7: grupos encontrados en Japón.
- AG-8: ubicado en Australia, el pacífico noroeste de los Estados Unidos y el Reino Unido.
- AG-9: Encontrado en Alaska y en Oregón.
- AG-10: También encontrado en el pacífico noroeste de los Estados Unidos.

#### f) Hospederos

Se reportan como hospederos de *Rhizoctonia solani* una amplia gama de especies: *Aglaonema simplex* Blume, *Agrostis alba* L., *Agrostis palustris* Huds., *Aleurites fordii* Hemsl., *Amaranthus retroflexus* L., *Andropogon ischaemum* L., *Andropogon virginicus* L., *Annona* L., *Anthoxanthum odoratum* L., *Antirrhinum majus* L., *Arachis hypogaea* L., *Aristida oligantha* Michx., *Avena sativa* L., *Basella alba* L., *Berberis thunbergii* (D.C.), *Beta vulgaris* L., *Brassica oleracea* L., *Bromus inermis* Leyss., *Campanula* L., *Capsicum annuum* L., *Celastrus scandens* L., *Chloris gayana* Kunth, *Chrysanthemum* L., *Cicer arietinum* L., *Cichorium endivia* L., *Citrus aurantium* L., *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Coffea arabica* L., *Crotalaria striata* A.Braun, *Cynodon dactylon* L. Pers., *Dactylis glomerata* L., *Dianthus caryophyllus* L., *Digitaria ischaemum* Ohwi, *Eichhornia crassipes* Mart. Solms, *Eremochloa ophiuroides* Munro Hack., *Festuca elatior* L., *Festuca rubra* Krecz. & Bobrov, *Festuca* L., *Ficus* L., *Fragaria* L., *Glycine max* L. Merr., *Gossypium* L., *Hibiscus cannabinus* L., *Hordeum gussoneanum* Parl., *Hordeum sativum* Jess., *Hordeum vulgare* L., *Lactuca sativa* L., *Lens culinaris* Medik., *Lespedeza cyrtobotrya* Miq., *Lespedeza stipulacea* Maxim., *Lilium auratum* L., *Lotus corniculatus* L., *Lotus uliginosus* Hoffman, *Lunaria annua* L., *Lycopersicum esculentum* Mill., *Manihot esculenta* Crantz, *Maranta* L., *Medicago sativa* L., *Melilotus albus* Desr., *Melilotus*

(L.) Mill., *Muhlenbergia schreberi* J.F. Gmel., *Nicotiana tabacum* L., *Oryza sativa* L., *Panicum dichotomiflorum* Michx., *Papaver somniferum* L., *Parthenocissus tricuspidata* Siebold & Zucc., *Paspalum notatum* Flüggé, *Paspalum pubescens* Lag., *Phalaris arundinacea* L., *Phaseolus lunatus* Billb.ex Beaurl., *Phaseolus* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Phleum pretense* L., *Pinus strobus* L., *Pisum sativum* L., *Poa pratensis* L., *Prunus persica* L. Batsch, *Robinia pseudoacacia* L., *Rubus* L., *Sciadopitys verticillata* Siebold & Zucc., *Setaria lutescens* Weigel ex Stuntz., *Solanum melongena* L., *Solanum tuberosum* L., *Sophora japonica* L., *Sporobolus* R. Br., *Tridens flavus* L., *Trifolium pretense* L., *Trifolium subterraneum* L., *Triodia flava* L., *Triticum aestivum* L., *Vicia* L., *Vigna unguiculata* L., *Vinca minor* L., *Vinca* L., *Zea mays* L., *Zoysia japonica* Steud., *Zoysia matrella* L. Mer..

Los síntomas en la mayoría de hospederos incluyen: podredumbre a nivel de raíz, hipocótilo, corona, tallo, rama, vaina, chancro del tallo y tizón en plántula (Kiliçoğlu y Özkoç 2010, Farr y Rossman 2018).

#### g) Patogenicidad

*Rhizoctonia* tiene la capacidad de producir una coloración en la zona de avance del tejido de su huésped, lo que podría sugerir que el mismo sea producto de sustancias no específicas producidas por el hongo. Esto explicaría por qué posee una gran cantidad de hospederos característico de organismos necrotróficos (Ajayi-Oyetunde y Bradley 2018).

Ajayi-Oyetunde y Bradley (2018), describen la capacidad de *Rhizoctonia solani* de producir enzimas pectinolíticas y celulolíticas, las cuales degradan las paredes celulares más comunes, además de otras enzimas más específicas como la poligalacturonasas y

pectin-lasas, que están involucradas en la patogenicidad de *Rhizoctonia solani* para cultivos como frijol, algodón y remolacha, así como otros metabolitos tóxicos no enzimáticos que están asociados con la patogenicidad del organismo a la soya, arroz, tomate y frijol. A pesar de esto, aún se desconoce la participación de estas enzimas específicas y metabolitos en cada uno de los hospederos mencionados, ya que puede variar tomando en cuenta la especificidad de la cepa y la agresividad de los grupos de anastomosis patogénicos (Ajayi-Oyetunde y Bradley 2018).

### III. Materiales y Métodos

#### A) Identificación morfológica de cepas

La identificación de las cepas se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC), ubicado en la Universidad de Costa Rica. Las cepas puras se mantenían en viales con medio de cultivo de PCA a 4°C. Para su estudio se transfirieron a medio de cultivo PDA, y se incubaron por tres semanas aproximadamente a una temperatura de 24°C. Se revisaron en el microscopio para una identificación previa de género basado en su morfología.

##### 1. Género *Fusarium*

Para la identificación de las cepas del género *Fusarium* se observaron las características macroscópicas, específicamente, la coloración de la colonia en medio de PDA, así como las características microscópicas: microconidios, macroconidios, número de septos, fiálides y clamidosporas. Se midió el largo y ancho en micras ( $\mu\text{m}$ ), se realizaron diez repeticiones para cada una de las estructuras: microconidios,



macroconidios, fiálides, clamidosporas. La clave dicotómica utilizada para la identificación fue la elaborada por Booth (1971) y la descripción morfológica realizada por Leslie *et al.* (2006).

## 2. Género *Rhizoctonia*

Se realizó una descripción morfológica de las colonias, tomando en consideración la coloración y la cantidad de núcleos en cada célula.

Para la observación y el conteo de los núcleos se usó la técnica de tinción de núcleos descrita por Sneh *et al.* (1991), en la que se recubre un portaobjetos con medio agar agua (AA) y se le coloca un pequeño trozo de micelio en crecimiento activo, luego se incuba por 48 horas a 24°C en oscuridad. Pasado el tiempo se removió cuidadosamente el trozo de micelio original, ya que las hifas se habían expandido al AA del portaobjetos. Se procedió a teñir el micelio con una gota de solución de fenosafranina al 0.1%, seguido de una gota de solución de KOH al 3%, se cubrió con un cubreobjetos y se llevó al microscopio para observar la tinción de núcleos en las hifas. Para este procedimiento se realizaron diez lecturas en diferentes puntos del micelio. Además, a las cepas cultivadas en PDA se evaluó la presencia o ausencia de esclerocios.

## 3. Mantenimiento de cepas

Todas las cepas fueron mantenidas en viales de 30 mL con Potato Carrot Agar (PCA) como medio nutritivo, en conjunto con aceite mineral a temperatura de 4 grados centígrados.

## B) Identificación molecular

### 1. Extracción de ADN

Este procedimiento se llevó a cabo en la Escuela de Biología en colaboración con Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica. La extracción de ADN se realizó a partir de micelio cultivado por una semana en medio líquido (caldo de papa o PDB). Se extrajo una pequeña porción del micelio y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, luego se le añadió 80  $\mu\text{L}$  de solución del reactivo de extracción Prepman™ Ultra (Life Technologies), seguidamente se maceró con un pistilo y se dejó reposar en un baño maría por 15 minutos. Después de dos minutos de enfriamiento a temperatura ambiente se centrifugó a 11 000 rpm por dos minutos y treinta segundos, se separó el supernatante, donde se encuentra el ADN, para ser suspendido en 180  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril.

### 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando una solución de Taq Green Mastermix a 12,5  $\mu\text{L}$ , y se agregó una cantidad de 1,25  $\mu\text{L}$  de los imprimadores para la región ITS del ribosoma nuclear (ITS4 e ITS 5), 7  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura y 1  $\mu\text{L}$  de DMSO. Se añadieron todos los reactivos a un microtubo que se mantuvo en frío y se homogenizó en vortex por 5 segundos, luego se depositaron 23  $\mu\text{L}$  a cada uno de los tubos con 2  $\mu\text{L}$  del ADN de las muestras.

Seguidamente, se introdujo las muestras en el termociclador BIO-RAD, T100-Thermal Cycler donde se llevó el proceso de PCR por tres horas. El programa utilizado fue el siguiente:

- 94°C por 2 minutos x 1 repetición
- 94°C por 35 segundos y 66°C por 55 segundos x 9 repeticiones
- 94° C por 35 min y 56 °C por 55 segundos y 72°C por 1,30 minutos por 35 repeticiones.

Una vez completado el ciclo de reacciones, los productos amplificados se fraccionaron por medio de electroforesis para determinar si el producto de PCR amplificó la cantidad de mega pares de bases esperado. Para ello se agregó una alícuota de 4 µl del producto de PCR de cada una de las cepas, de la escalera de peso molecular y la muestra testigo a cada uno de los pocillos del gel de agarosa en solución buffer de 1x, durante 35 minutos a 80 voltios. El producto de PCR obtenido fue enviado a secuenciar a Laboratorios Macrogen, Corea.

Una vez recibidas las secuencias y cromatogramas, se procedió a comparar estas con las depositadas en la base de datos BLAST, para tratar de determinar la especie del organismo con base en el porcentaje de similitud y el E-value.

### C) Producción de inóculo

Se evaluó la producción de inóculo con tres metodologías, las dos primeras establecidas por Singleton *et al.* (1993) y la tercera por Pérez *et al.* (2013).

**Metodología 1.** Inoculación a partir del micelio del hongo. Para esto se utilizaron pequeños bloques cortados del medio donde se desarrolló el hongo, en este caso en PDA por una semana a 25° por 12 horas luz y 12 oscuridad, y se realizó un lavado de esporas que se utilizaron para inocular arroz crudo, el cual se autoclavó previamente y se incubó por 12 días entre 20-25°C.

**Metodología 2.** Producción de inóculo en frascos de Erlenmeyer. Se inoculó medio líquido PDA acidulado a pH de 5.8, se utilizó arroz humedecido por 24 horas en agua fría o 2-3 horas en agua caliente, los frascos fueron autoclavados por una hora y media por dos días consecutivos y se dejaron enfriar, se inoculó con el hongo para posteriormente incubar durante 2-3 semanas.

**Metodología 3.** En medio de cultivo PDA se desarrolló el hongo por una semana a temperatura 26°C, se tomaron cuadros de 0,5 cm de lado y se agregó a un erlenmeyer que contenía 26 g de arroz previamente esterilizado doblemente. Una vez agregados los cuadros del medio de cultivo se mantuvo por 28°C durante 15 días. Se agregó 30 ml de agua destilada autoclavada como opción.

**Metodología alternativa (Ruppel *et al.* 1979).** Se desarrolló el hongo en medio de PDA por una semana, se tomaron cuadros del medio con el crecimiento del hongo y se inocularon a 100g de cebada previamente esterilizada en autoclave, se dejó incubar a una temperatura de 28° durante 15 días.

## D) Prueba de patogenicidad

El experimento se ubicó en Finca 9, en el sector de Río Frío en el vivero perteneciente a Standard Fruit Company. El suelo del área utilizada, aproximadamente

80 m<sup>2</sup>, fue tratada con mancozeb a una dosis de 125 mL/L de ingrediente activo para evitar contaminación del sustrato de las plántulas a inocular. Este sustrato fue elaborado a base de granza 42 %, aserrín 42% y compost 16% únicamente, esterilizado en autoclave a 2 bares de presión por una hora a 121°C.

Se utilizaron plántulas de banano de la variedad Gran Enano Ecuatoriano subgrupo Cavendish, producidas *in vitro* y con seis semanas de crecimiento. Se sembraron en bolsas negras de polietileno de 750 ml y de uso regular en el vivero y se llenaron con sustrato mezclado con 100 g de arroz o cebada colonizados en su totalidad por las cepas de *Fusarium* y *Rhizoctonia* respectivamente, además, se incluyó un grupo testigo el cual no fue inoculado.

Se mezcló manualmente con el sustrato utilizando guantes para evitar la contaminación, sembrando de forma inmediata la planta. Las plantas se mantuvieron en campo por dos meses, bajo el manejo regular de la compañía en cuanto a fertilización y riego.

Las condiciones de lluvia durante la prueba de patogenicidad variaron en la zona de Río Frío. Se presentaron fuertes lluvias de forma intercalada con días con poca precipitación. El 24 de marzo fue el día con mayor precipitación alcanzando 62,80 mm acumulados y cerca de comienzos de abril no se presentaron lluvias acumuladas. El sitio alcanzó temperaturas máximas entre 26°- 34°C y temperaturas mínimas de 18° – 21° C (Figura 1).

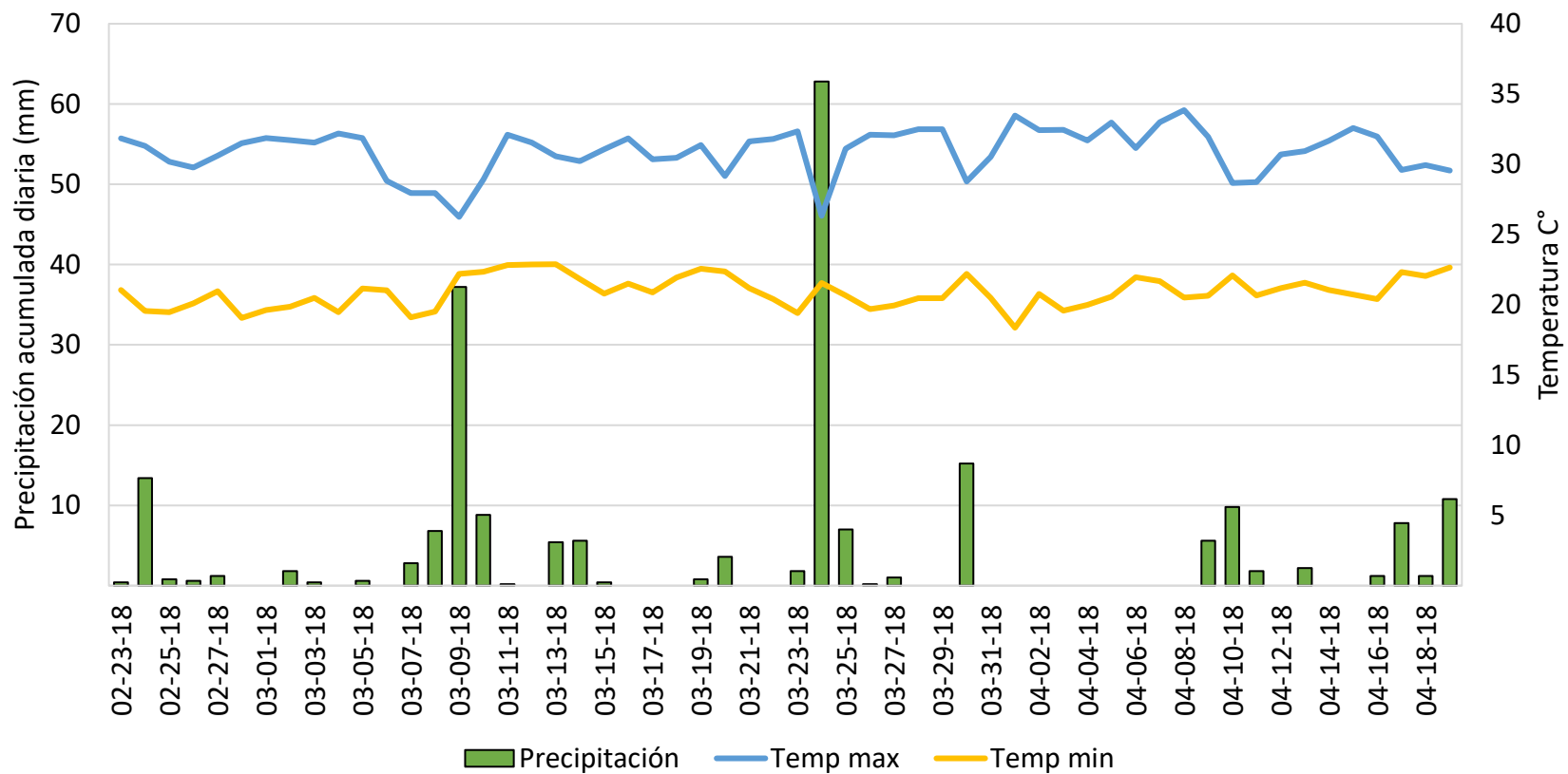


Figura 1. Precipitación acumulada y temperatura diaria registradas para la zona de Río Frío durante los meses de febrero, marzo y abril, período en el que se efectuó la prueba de patogenicidad en vivero.

## 1. Evaluación de síntomas

La evaluación de síntomas se realizó de forma semanal, a partir de la semana siguiente a la inoculación. Se describieron los síntomas observados y se evaluó la incidencia de daños para cada cepa y luego se trasladaron las plantas dañadas al laboratorio del Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC), ubicado en la Ciudad de la Investigación, San Pedro, para realizar el aislamiento a partir de los diversos síntomas observados. Las muestras se mantuvieron en el cuarto frío a 4°C hasta su procesamiento.

## 2. Aislamiento a partir de tejido

Se realizó un lavado de raíces para eliminar los residuos de suelo y las plantas con necrosis radical severa se eliminaron debido a que no existía tejido para recuperar. Además, se describió el síntoma observado a nivel de raíz y de cormo, con algunas excepciones en el pseudotallo si se presentaba algún síntoma.

Se procedió a realizar el aislamiento en medio de cultivo de agar agua con rosa bengala y cloranfenicol (AARBCI) para así disminuir la contaminación de agentes como bacterias u otros hongos de rápido crecimiento. El tejido se desinfectó por 30 segundos en alcohol al 70%, de inmediato se cortó y se dispuso en cinco puntos sobre el plato Petri. Se incubó a 24 °C a la oscuridad por una semana, luego se separó las colonias desarrolladas en el mismo medio y una vez puro se trasladó a los medios de cultivo PDA y AA.

### 3. Identificación de organismos producto del aislamiento

Se revisaron las características macromorfológicas de cada cepa obtenida se le determinó sus características macromorfológicas, para identificar de forma morfológica si se trataba del organismo inoculado. En el caso de las cepas de *Fusarium* se realizó una selección de colonias y se montó en medio de CLA, con la finalidad de comparar sus estructuras con las cepas originales, y para promover la producción de esporodoquios útiles para la producción de cultivos monospóricos.

### 4. Cultivos monospóricos

Cada cepa identificada como *Fusarium* fue sembrada en medio de CLA, en donde se mantuvo por tres semanas para producir esporodoquios, además se tomó una sección de micelio, para depositarlo en medio de agar agua al 3% y se mantuvo por dos o tres días a una temperatura aproximada de 22 – 24°C. Una vez con el crecimiento nuevo del micelio se tomó la punta de una hifa con ayuda de un estereoscopio, la cual fue depositada en medio de PDA para obtener un cultivo monospórico para la secuenciación de productos de PCR.

### 5. Extracción y secuenciación de ADN

Las cepas fueron enviadas al laboratorio de Técnicas Moleculares perteneciente al Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos de la Universidad de Costa Rica, para la realización de la extracción de ADN y la amplificación de secuencias específicas por PCR y posteriormente los productos de amplificación fueron enviados al laboratorio de Macrogen para la secuenciación.



## I.V Resultados

### A) Identificación morfológica de aislamientos

#### 1. Coloración de la colonia

Las cepas mostraron variedad en cuanto la expresión cromática, la zona área del micelio presentó en todas las cepas coloraciones blancuzcas. Por lo contrario, la zona debajo del micelio en las cepas 1T, 4T, 5T, 7T, 8T y 9T presentaron coloraciones violáceos y rosas; mientras que, las cepas 2T, 3T y 11T mostraron coloraciones marrones y cafés.

Cuadro 1. Coloración de las colonias mantenidas por siete días en medio de cultivo PDA a +/- 24°C en oscuridad.

<b>Código de cepa</b>	<b>Coloración arriba</b>	<b>Coloración debajo</b>
1T	Blanco	Blancuzca levemente amarillenta
2T	Blanco	Amarillenta con tonalidades cafés
3T	Marrón, café oscuro y amarillenta, blanco a los bordes	Marrón, café oscuro y amarillenta con tonos naranjas
4T	Blanco	Tonalidades durazno-salmón en el crecimiento más maduro, mientras a los bordes tonalidades blancas.
5T	Blanco	Tonalidades lilas o rosadas en el centro del micelio, bordes blancos.
7T	Tonalidades amarillentas y marrones en el centro del cultivo.	Tonalidades amarillentas y marrones en el centro del cultivo.
8T	Blanco	Blanco con tonalidades rosas o violetas.
9T	Blanco	Blanco con tonalidades rosas y naranjas a los bordes y más violeta al centro.
11T	Blanco tornándose marrón con los días	Marrón y café oscuro al centro

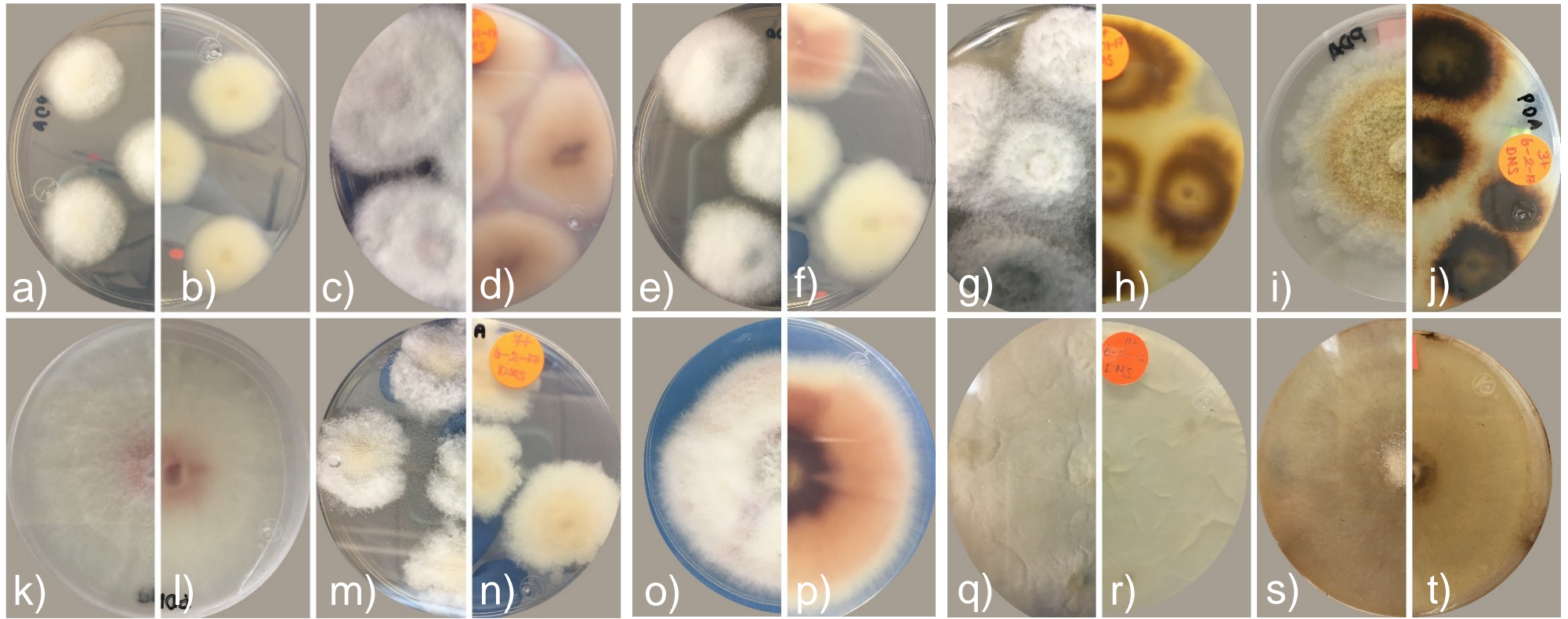


Figura 2. Coloración de las colonias en medio de cultivo PDA. a) y b) cepa 1T, c) y d) cepa 4T, e) y f) cepa 8T, g) y h) cepa 2T, i) y j) cepa 3T, k) y h) cepa 5T, m) y n) cepa 7T, o) y p) cepa 9T, q) y r) cepa 11T a 4 días de crecimiento, s) y t) cepa 11T a 7 días de crecimiento.

## 2. Características de estructuras

Las cepas identificadas como 1T, 4T, 5T, 7T, 8T y 9T se clasificaron dentro del género *Fusarium* por lo que se realizó una caracterización según las estructuras producidas. Por otro lado, las cepas 2T, 3T y 11T se identificaron como organismos pertenecientes al género *Rhizoctonia*.

Cuadro 2. Tipo de micelio y tipo de conidios para las colonias mantenidas por 7 días en medio de cultivo PDA a +/-24°C en la oscuridad.

Código de cepa	Tipo de micelio	Conidios							Clamidosporas
		Forma					Abundancia		Abundancia /Posición
		Tipo		Macro*		Micro*	Macro	Micro	
		Macro	Micro	Célula apical	Célula basal				
1T	Septado	+	+	“Blunt”	“Barely notched”	ovoides y reniformes	++	+	+++/ I, T
2T	Septado, hifas unidas en ángulo de 90°C Constricción de hifa en el punto de origen	-	-	-	-	-	-	-	-
3T		-	-	-	-	-	-	-	-
4T	Septado	+	+	“Hooked”	“Distinctly notched”	ovoides	+	+++	+++/ I, T
5T		+	+	“Blunt”	“Barely notched”	ovalados - ovoides	+	+	-
7T		+	+	“Tapering”	“Footshaped”	ovalados	++	+	+++/ I, T
8T		+	+	“Blunt”	“Barely notched”	ovalados	+	+	++/ I, T
9T		+	+	“Blunt”	“Barely notched”	ovalados	+	+	+/ I, T
11T	Septado, hifas unidas en ángulo de 90°C Constricción de hifa en el punto de origen	-	-	-	-	-	-	-	--

\*Se utilizó la clave propuesta por Leslie y Summerell (2007). - Ausencia de estructura + Presencia de estructura, ++ abundantes, +++ muy abundantes. I: Intercalar, T: Terminal (el orden indica la posición más común).

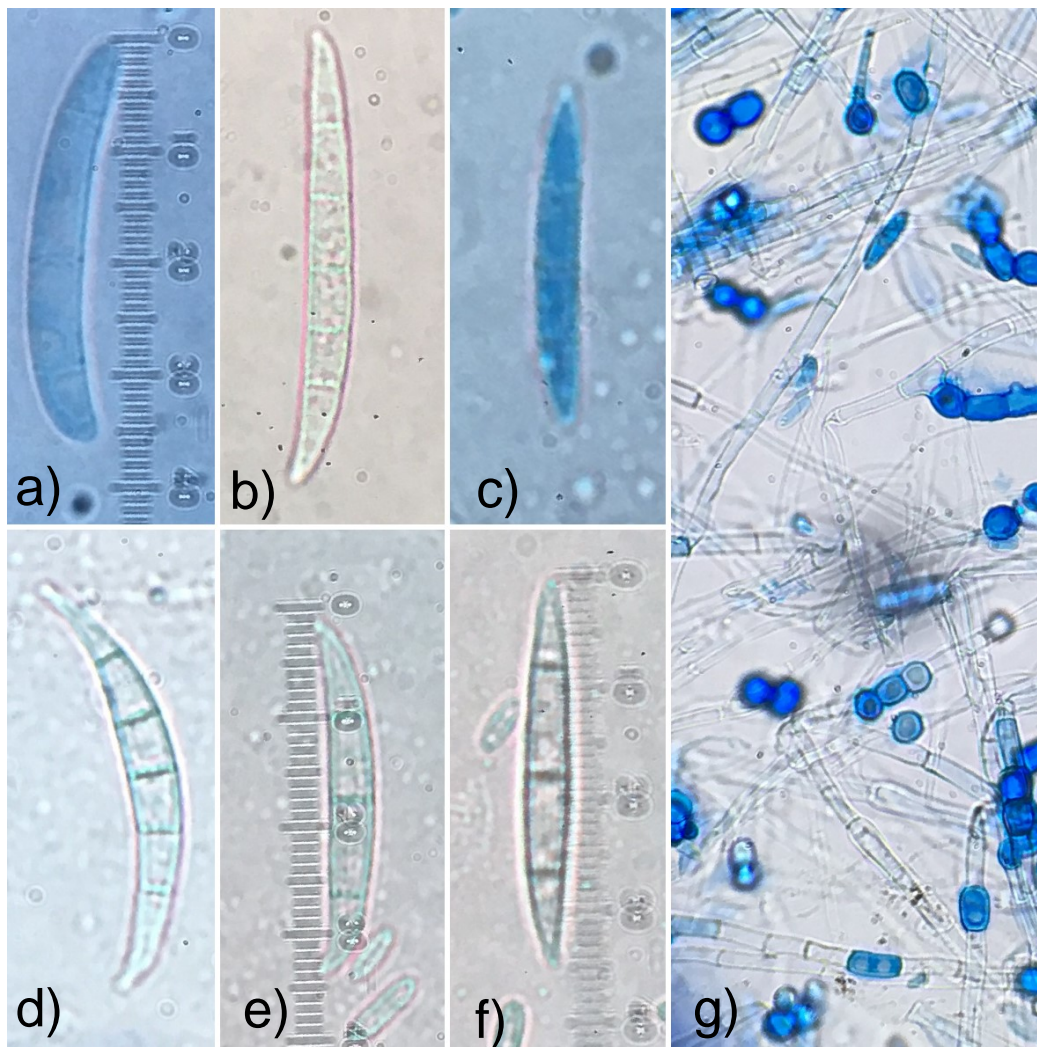


Figura 3. Macroconidios producidos en cada una de las cepas identificadas como *Fusarium*. a) cepa 1T, b) cepa 4T, c) cepa 5T, d) cepa 7T, e) cepa 8T, f) cepa 9T, g) clamidosporas pertenecientes a la cepa 1T.

Las estructuras producidas por las cepas asociadas al género *Fusarium* presentaron diferencias en sus mediciones en todas las estructuras; únicamente las cepas 8T y 9T presentaron valores similares en las estructuras medidas. Las colonias 2T, 3T y 11T no generaron estructuras por lo que no se realizó su caracterización morfológica.

Cuadro 3. Características morfométricas de macro y microconidios de las cepas mantenidas por 7 días en medio de cultivo CLA a +/-24C a la oscuridad.

Código de cepa	Macroconidios			Fiálides			Clamidosporas
	# de septos	Ancho $\mu\text{m}$	Largo $\mu\text{m}$	Tipo	Ancho $\mu\text{m}$	Largo $\mu\text{m}$	
1T	3,0	5,7	34,9	mono	2,5	90,5	8,0
2T	-	-	-	-	-	-	-
3T	-	-	-	-	-	-	-
4T	3,7	3,5	39,6	mono	3,9	10,9	8,1
5T	2,6	2,9	23,8	mono	2,9	23,8	--
7T	4,8	4,5	34,4	mono	2,8	4,6	11,9
8T	3,5	3,7	22,8	mono	2,4	14,0	6,2
9T	3,0	2,6	29,1	mono	2,6	14,0	7,8
11T	-	-	-	-	-	-	-

Los organismos 2T, 3T y 11T identificados como *Rhizoctonia* de los cuales se obtuvo únicamente crecimiento micelial, muestran diferencias en su morfometría para el micelio. La formación de esclerocios ocurrió particularmente en la cepa 3T, además el número de núcleos por célula (entre septo y septo) para las cepas 3T y 11T fue mayor a tres núcleos por célula.

Cuadro 4. Características morfométricas para el micelio de las cepas 2T, 3T y 11T, mantenidas por 7 días en medio de cultivo PDA a +/-24°C en oscuridad.

Código de cepa	Micelio		Esclerocios	# de núcleos promedio por célula
	Ancho $\mu\text{m}$	Largo $\mu\text{m}$		
2T	2,7	35,3	-	2,9
3T	7,5	36,0	+	>3
11T	5,0	97,5	-	>3

- Ausencia de estructura + Presencia de estructura

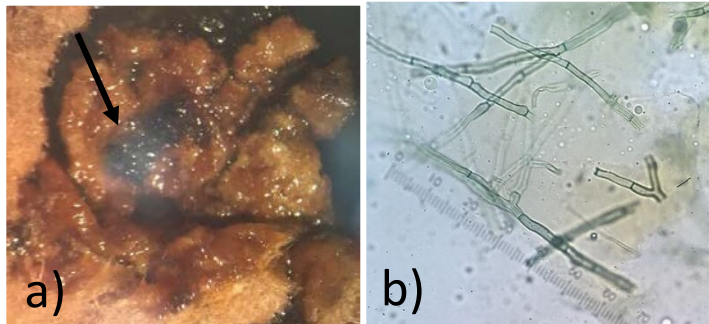


Figura 4. Presencia de esclerocios en cepa 3T. a) coloración del esclerocio en medio de PDA. b) morfología del micelio proveniente del esclerocio en lente de 100X.

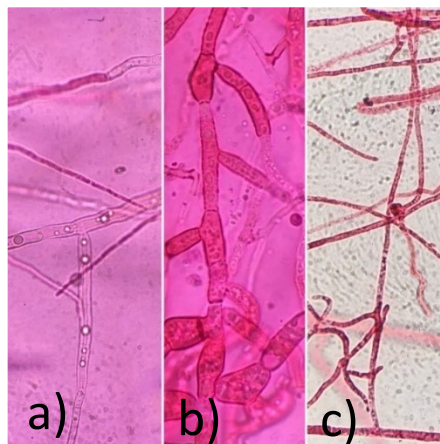


Figura 5. Vista de las hifas y sus núcleos de las cepas identificadas *Rhizoctonia*, teñidas con fenosafranina al 0.1%. a) cepa 2T, b) cepa 3T, c) cepa 11T.

## B) Identificación molecular

La amplificación de un producto específico utilizando el imprimador ITS5 indicó que el ADN extraído de las colonias provenientes de tejido radical de banano corresponde a las especies *Fusarium solani* (cepa 1T) y *Fusarium oxysporum* (4T, 5T, 8T y 9T). Pero, por otro lado, los resultados obtenidos para las cepas 2T, 3T, 7T y 11T no coinciden con los observado en la caracterización morfológica.

Mediante el análisis de la identidad de género y especie de los cultivos obtenidos a partir del producto de PCR, los análisis realizados en la base de datos del NCBI y el Blast mostraron valores de identidad de 100%, 99% y 96% para especies de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, lo que verifica la identidad de estas. (Cuadro 5.).

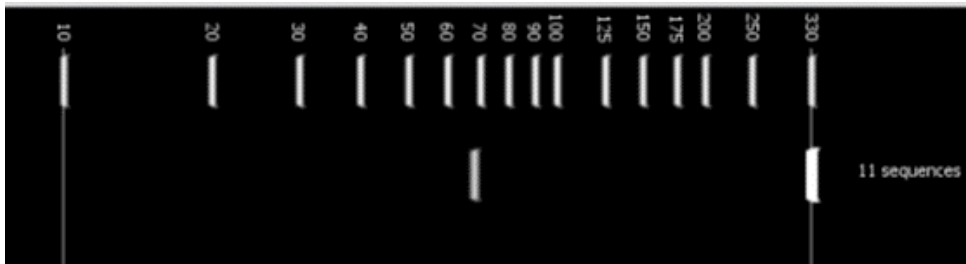


Figura 6. Producto de gel virtual obtenidos mediante el uso de imprimadores ITS.

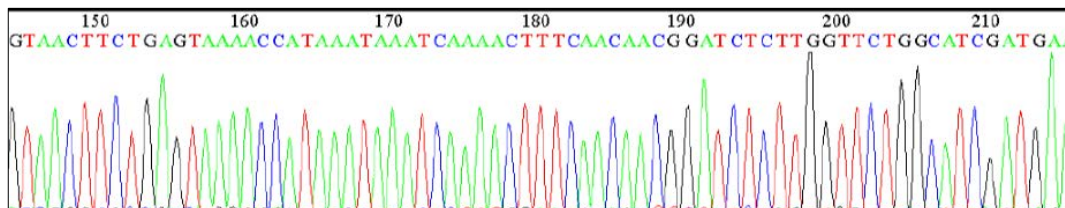


Figura 7. Ejemplo de cromatograma para la región de ITS del aislamiento de *Fusarium oxysporum* (cepa 5T), asociado al deterioro radical en banano.

Cuadro 5. Análisis de la región ITS de géneros aislados de raíces de banano en diferentes zonas bananeras en la región de Rio Frío.

<b>Código de cepa</b>	<b>Especie identificada (NCBI – accesión)</b>	<b>Número de nucleótidos</b>	<b>Max Score</b>	<b>Máxima identidad</b>
1T	<i>Fusarium solani</i> , KT441029.1	523	963	99%
2T	Nectriaceae sp., KX953532	319	319	98,7%
3T*	<i>Colletotrichum cliviae</i> , KX578803	524	524	93,3%
4T	<i>Fusarium oxysporum</i> , MH055398.1	506	935	100%
5T	<i>Fusarium oxysporum</i> , MH001545.1	512	946	100%
7T*	Auriculariales sp., KJ831937	410	410	92,2%
8T	<i>Fusarium oxysporum</i> , MG020429.1	520	961	100%
9T	<i>Fusarium oxysporum</i> , EF495238.1	454	780	96%
11T*	<i>Cladosporium</i> sp., KM053240	483	483	94%

Resultados obtenidos del análisis por el Blast. \*Ver Anexo 1.

### C) Elección de protocolo para multiplicación de inóculo.

De las metodologías propuestas se seleccionó la metodología tres. Para las cepas identificadas como especies de *Fusarium* se utilizó arroz mientras que las colonias identificadas como *Rhizoctonia* se modificó la metodología por un sustrato de cebada.



Cuadro 6. Evaluación cualitativa del protocolo para la multiplicación de inóculo.

Metodología	Producción de micelio	Contaminación	Tiempo de incubación
1	Poco micelio, sustrato no recubierto	Presencia de Bacterias, Levaduras	22 días
2	Poco micelio, sustrato no recubierto	Presencia de Bacterias, Levaduras	30 días
3	Sustrato recubierto	Sin contaminación	15 días

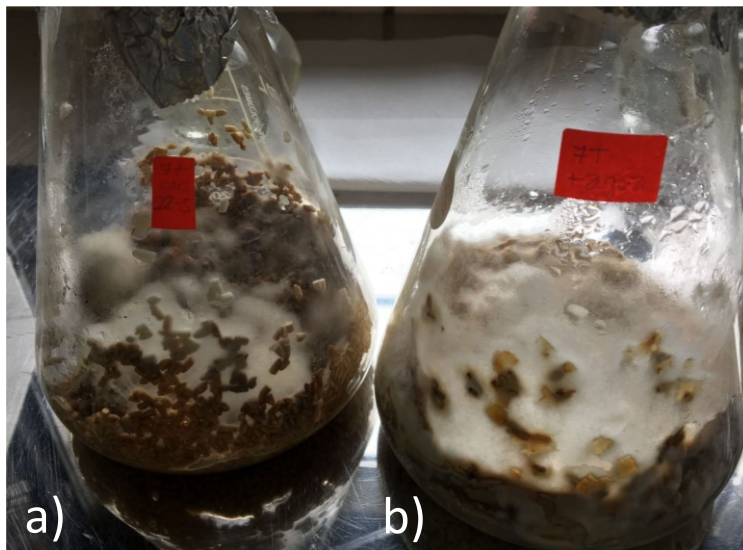


Figura 8. Pruebas para la producción de inóculo en erlenmeyers para metodología 3. a) matriz sin agua. b) matriz con agua agregada.

## 1. Etapa de producción de inóculo

El promedio de conidios/ml inoculado en los potes a partir del sustrato de arroz o cebada mostró aumento, pasando de cien mil unidades formadoras de colonia (UFC) a un millar de UFC, en un tiempo de 44 días de incubación.

Cuadro 7. Promedio de esporas inoculado en la etapa de producción de inóculo.

Código de cepa	Promedio de conidios/ml inoculado a las bolsas	Promedio de conidios/ml Inoculado a los potes
1T	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^7$
2T	*	*
3T	Sin producción	Sin producción
4T	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^6$
5T	$7 \times 10^5$	$3 \times 10^6$
7T	$6 \times 10^5$	$3 \times 10^6$
8T	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^7$
9T	$6 \times 10^5$	$6 \times 10^6$
11T	Sin producción	Sin producción

\*cepa 2T eliminada debido a errores metodológicos.

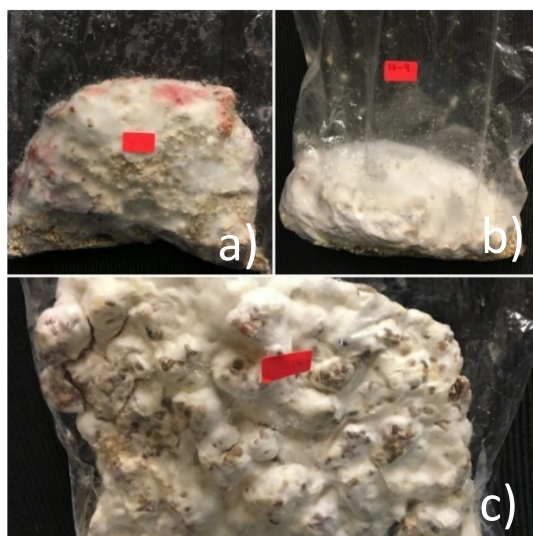


Figura 9. Inóculo utilizado para la prueba en la etapa de vivero. a) y b) medio de arroz quebrado cubierto con el desarrollo del hongo. c) medio de cebada cubierto con el desarrollo del hongo.

## D) Prueba de Patogenicidad

### 1. Porcentaje de síntomas presentados en los tratamientos.

Los resultados en las pruebas de patogenicidad mostraron síntomas muy similares en todos los tratamientos. Los primeros síntomas se presentaron tres días después de la inoculación: en la zona aérea incluyeron clorosis en las hojas nuevas, ausencia de la hoja candela, mientras que algunas plantas presentaron un “arrepollamiento”, enanismo e inclusive volcamiento. El daño radical se presentó en todas las plantas, el síntoma en común fue la presencia de necrosis en raíces de primer orden hasta el cormo, deteriorando el tejido de vascular de forma ascendente (Nec. Asc), e intercalar (Nec. Int.) con zona de avance de coloración rojiza o marrón, presencia de descortezamiento en la mayoría de los tratamientos y necrosis a nivel de cormo (Nec. Cormo) producto del daño radical.

Los tratamientos 8T y 9T ambos identificados como *Fusarium oxysporum* presentaron síntomas únicos, a saber: necrosis con textura coriácea en zonas más jóvenes del tejido radical; además, la cepa 9T presentó necrosis descendente proveniente del daño en el cormo. El tratamiento 7T no presentaron síntomas de descortezamiento (Descort.) a diferencia de los otros tratamientos. El testigo no presentó síntomas al final de la prueba en vivero

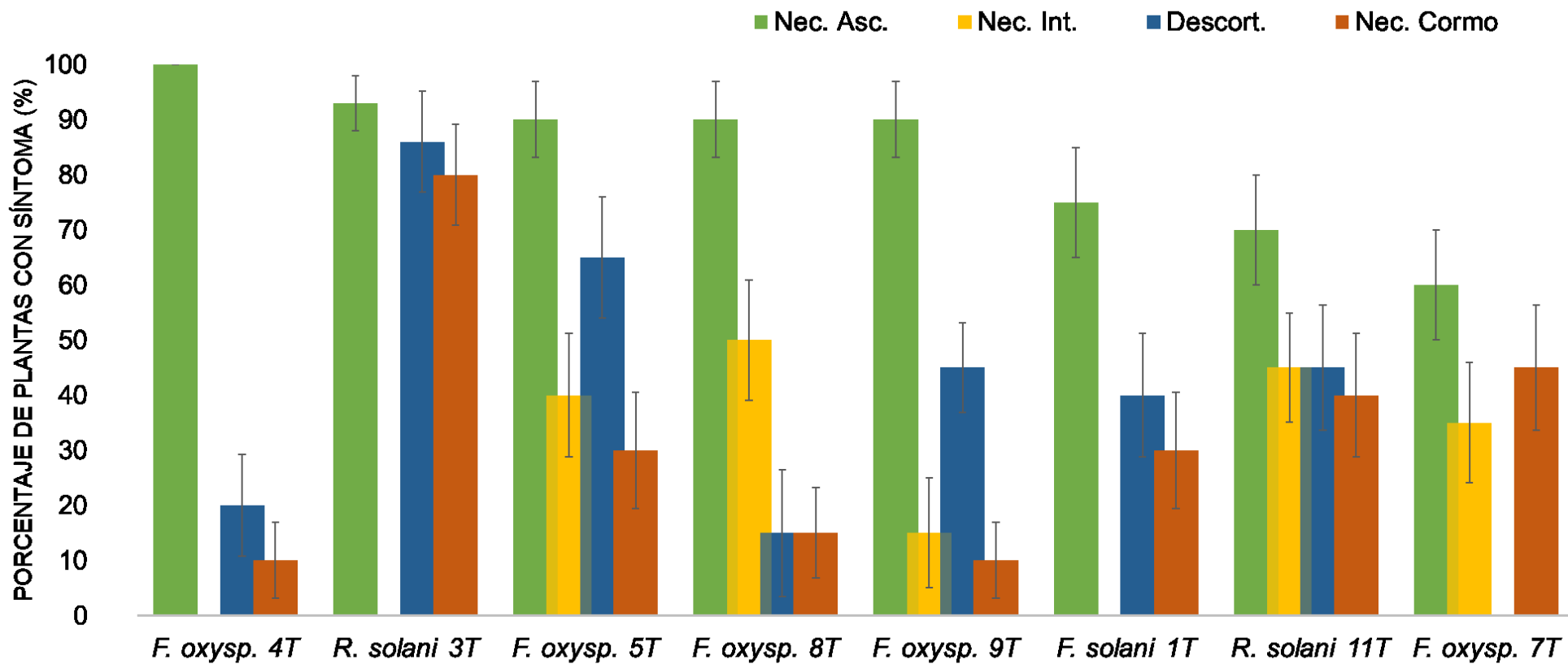


Figura 10. Porcentaje de plantas por tratamiento con presencia de síntoma después de 8 semanas de inoculación en condiciones de vivero en Río Frío.

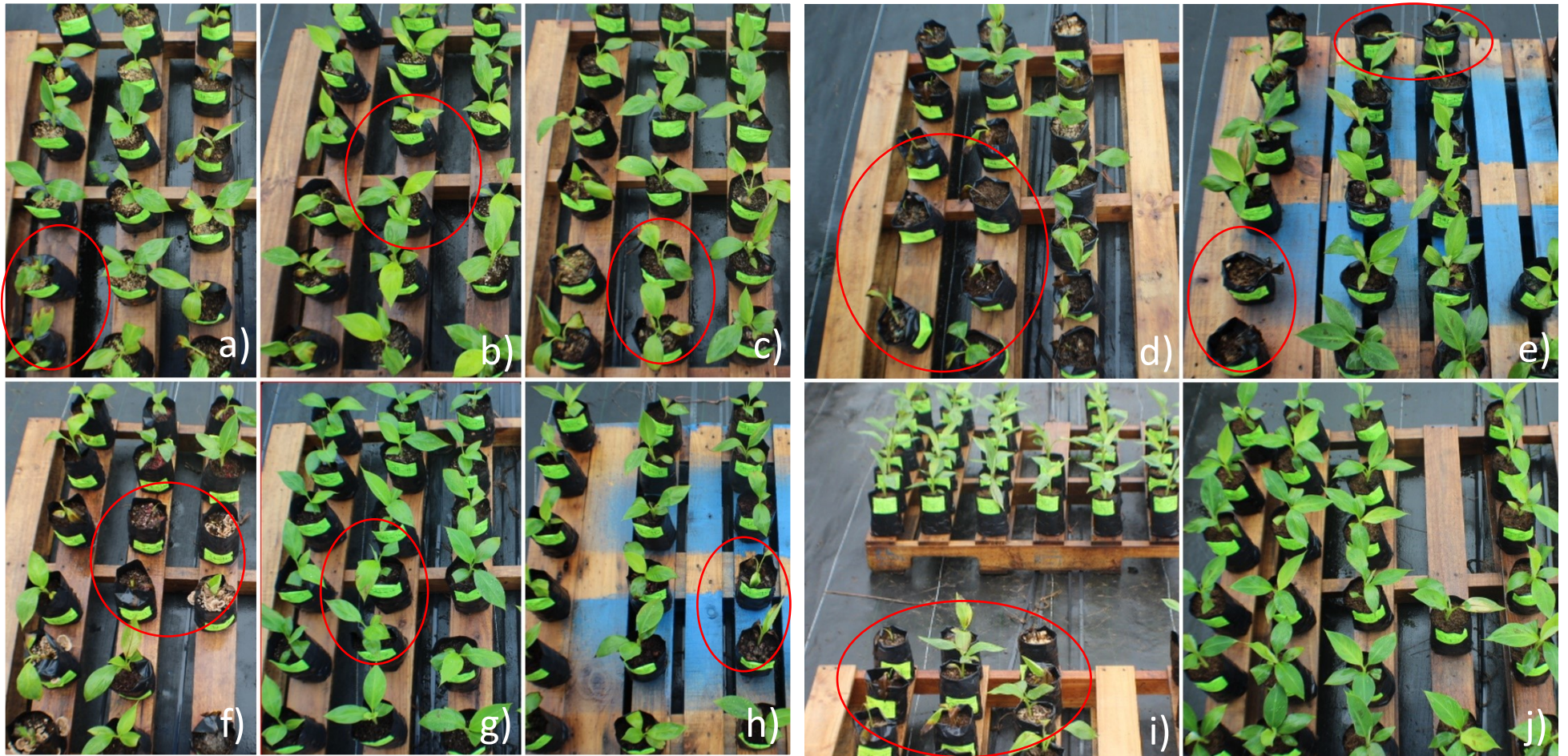


Figura 11. Síntomas generales durante la prueba de patogenicidad en vivero, se observa marchitez y pérdidas de unidades a) *F. solani* cepa 1T, b) *F. oxysporum* cepa 4T, c) *F. oxysporum* cepa 5T, d) *R. solani* cepa 3T, e) *R. solani* cepa 11,T f) *F. oxysporum* cepa 7T, g) *F. oxysporum* cepa 8T, h) *F. oxysporum* cepa 9T, i) Testigo (al fondo) vs. *R. solani* cepa 3T (frente), j) Testigo o control sin inocular.

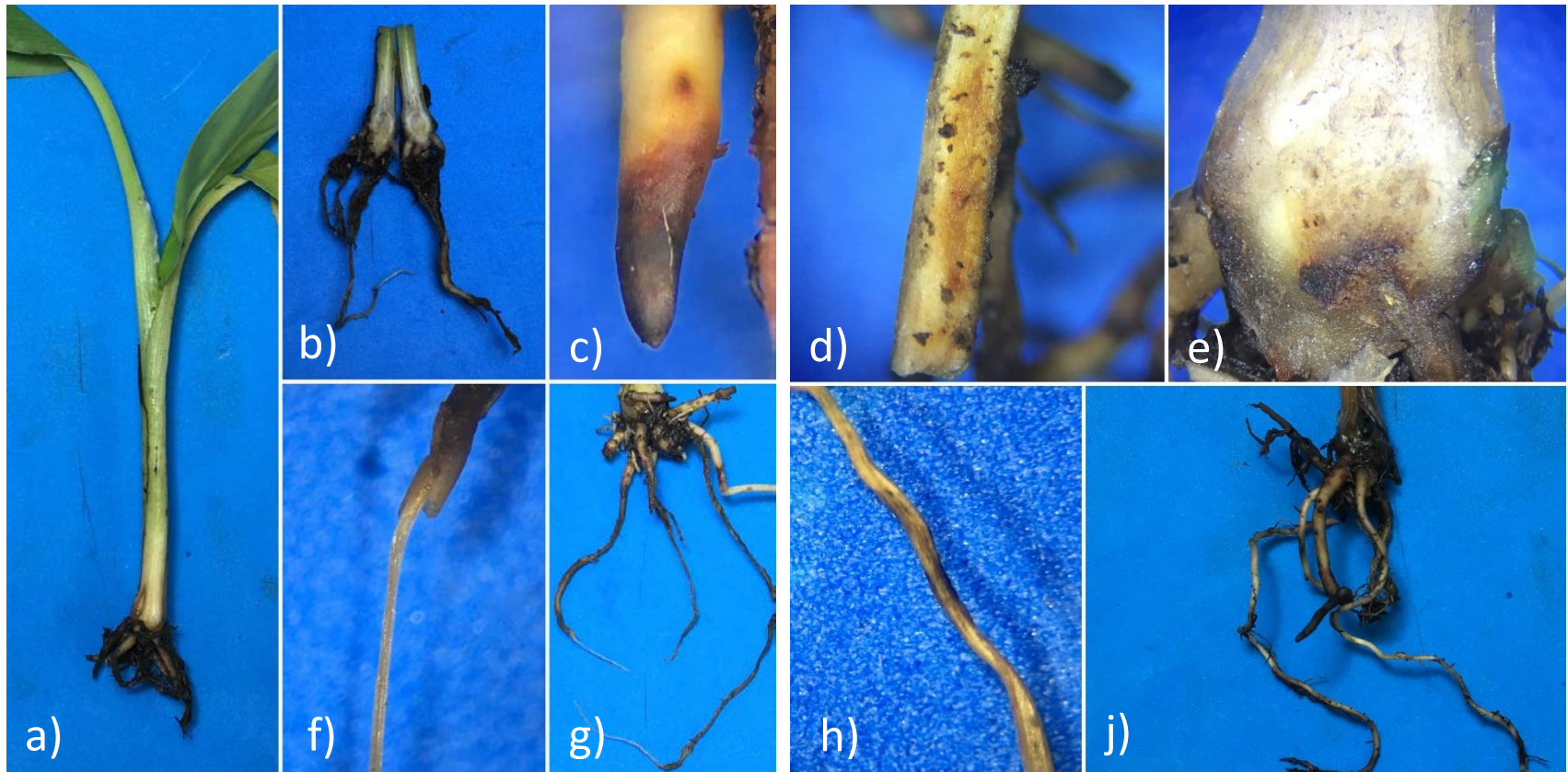


Figura 12. Síntomas generales obtenidos de la prueba de patogenicidad en vivero. a) Pérdida de raíces debido a la necrosis radical, b) Necrosis ascendente de la raíz hasta la zona del cormo, c) y d) Necrosis en la raíz con zona de avance ascendente, e) Afectación del cormo. f) y g) Descortezamiento del tejido radical de forma ascendente. h) y j) Daño intercalar en la zona radical.

## 2. Organismos recuperados por tratamiento.

Los organismos recuperados variaron según el tratamiento, es decir, de acuerdo con el hongo inoculado. Además, organismos de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*, se aislaron en todos los tratamientos, lo cual indica la funga típica del vivero.

Cuadro 8. Organismos obtenidos en las plantas, asociado después de 8 semanas de inoculación en condiciones de vivero en Río Frío.

<b>Código de cepa</b>	<b>Organismos recuperados</b>
<b>1T</b>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., bacteria no identificada
<b>3T</b>	<i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp.
<b>4T</b>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. bacteria no identificada
<b>5T</b>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp. bacteria no identificada
<b>7T</b>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., bacteria no identificada
<b>8T</b>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp.
<b>9T</b>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., bacteria no identificada
<b>11T</b>	<i>Fusarium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., bacteria no identificada
<b>Testigo</b>	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp.

### 3. Evaluación de incidencia de deterioro radicular

Todas las plantas presentaron síntomas en la zona radical, por lo que la incidencia fue de 100% en todos los tratamientos, mientras que no se observaron síntomas en las plantas del testigo no inoculado. Finalizando el periodo de prueba en vivero se evaluó la cantidad de plantas en pie para determinar la mortalidad. Los tratamientos 3T, 4T y 7T obtuvieron valores superiores a 50% de plantas con mortalidad, mientras que los demás tratamientos se mantuvieron cerca del 30% de mortalidad.

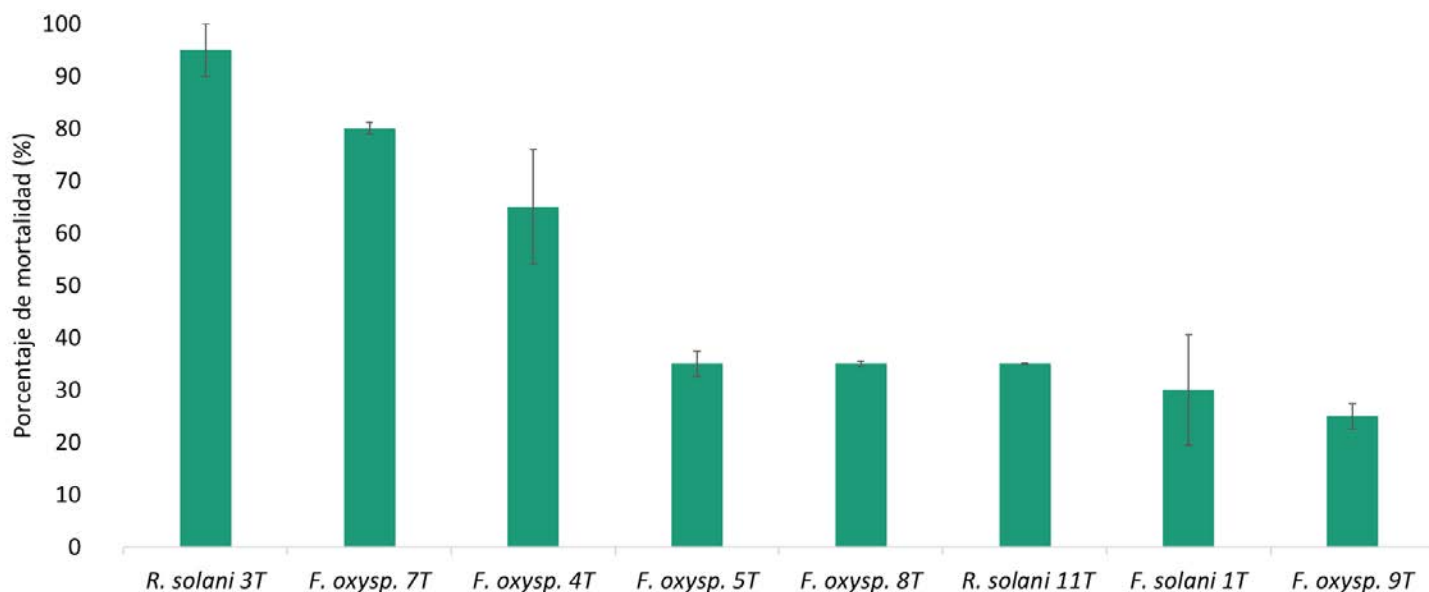


Figura 13. Porcentaje de mortalidad para cada una de las cepas inoculadas al final de la etapa de vivero



4. Corroboración de la identidad de los hongos recuperados de las pruebas de patogenicidad.

La secuenciación del factor de elongación mediante el uso de primers (EF-1 y EF-2) para las colonias recuperadas que presentaron características similares a las cepas inoculadas muestran que las plantas expuestas a las cepas 1T, 4T, 7T y 8T presentan síntomas típicos por los hongos inoculados e identificados, como se muestra en el Cuadro 9. No se recuperó ninguna colonia con las características morfológicas similares a *Fusarium oxysporum*, en las cepas 5T y 9T.

Cuadro 9. Análisis del factor de elongación para los organismos recuperados de la prueba de patogenicidad provenientes de raíces de banano en la zona de Rio Frío.

Código de cepa	Especie identificada (NCBI – accesión)	Número de nucleótidos	Máxima identidad
1T	<i>Fusarium solani</i> , HE647956	685	96.5%
4T	<i>Fusarium oxysporum</i> , KX365403	653	97,4%
7T	<i>Fusarium oxysporum</i> , LN828043	643	98,4%
8T	<i>Fusarium oxysporum</i> , LN828019	636	99.8%

- a) Tinción de núcleos de las cepas recuperadas asociadas con *Rhizoctonia solani* (cepas 3T y 11T).

Las cepas identificadas como *Rhizoctonia solani* (cepas 3T y 11T), se analizaron mediante la técnica de tinción de núcleos para realizar el conteo en cada célula (entre septo y septo), mientras que a las cepas extraídas de los síntomas asociados a *Rhizoctonia solani* (cepas 3T y 11T), se les realizó una evaluación morfométrica para verificar su similitud con las cepas originales (Cuadro 10).

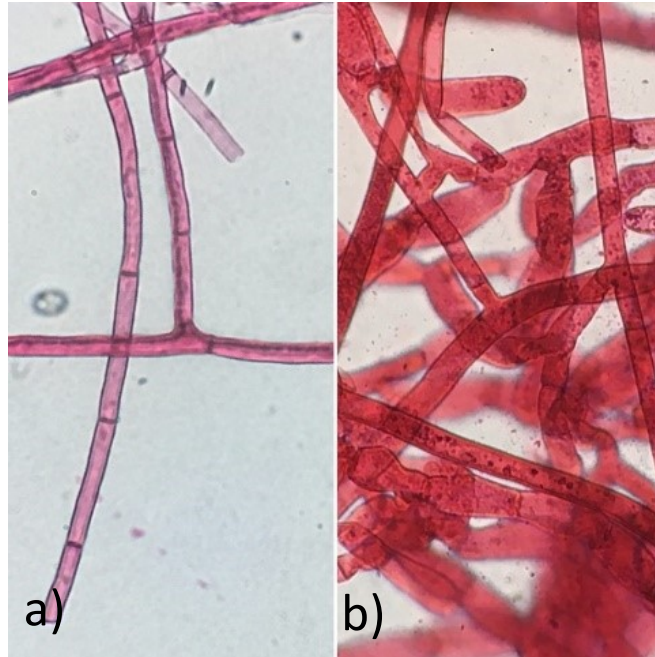


Figura 14. Vista de las hifas de los organismos obtenidos luego de la prueba de vivero asociados a *Rhizoctonia solani*, teñidas con fenosafranina al 0.1%. a) cepa 3T, b) cepa 11T.

Cuadro 10. Características morfométricas para el micelio de las cepas asociadas a *Rhizoctonia solani* (cepas 3T y 11T), mantenidas por 7 días en medio de cultivo PDA a +/-24°C en oscuridad.

Código de cepa	Micelio		Esclerocios	# de núcleos promedio por célula
	Ancho $\mu\text{m}$	Largo $\mu\text{m}$		
3T	4,0	36,3	-	>3
11T	7,0	112,1	-	>3

## V. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la identificación morfológica, tomando en cuenta la descripción del género realizada por Booth (1971) y Carling y Summer (1992), las cepas identificadas como 1T, 4T, 5T, 7T,8T y 9T pertenecen al género *Fusarium*. Este resultado concordó con la identificación molecular por medio de ITS.

La descripción realizada por Leslie y Summerell (2007), para la especie *Fusarium oxysporum* coincide con lo observado en las colonias 4T, 5T, 7T,8T y 9T. Además, la cepa 1T fue identificada como *Fusarium solani*, la cual hoy se conoce como un complejo de especies que aún no se han descrito formalmente (Hafizi *et al.* 2013).

A pesar de que se enviaron las cepas para realizar el análisis mediante el factor de elongación, los resultados obtenidos no fueron los esperados. Pese a que el porcentaje de similitud de los resultados se encuentra por arriba del 97%, la calidad de los cromatogramas mostró una baja calidad por lo que la identidad de las cepas no es suficientemente confiable y, por lo tanto, la identidad fue basada únicamente en lo mostrado por medio de la secuenciación de ITS y su caracterización morfológica.

Con relación a las cepas 2T, 3T y 11T, corresponden a organismos pertenecientes al complejo de especies de *Rhizoctonia solani*, quien es uno de los organismos fitopatógenos más importantes y se caracteriza por no producir esporas o conidios en su estado asexual, por poseer hifas multinucleadas, constricción en la hifa cercano al punto de origen en ángulo de 90°, coloración hialina que se torna marrón con la maduración de

la colonia, producción de células moniloides y esclerocios aunque, no todas las cepas las producen (Erper *et al.* 2016, Ajayi-Oyetunde y Bradley 2018).

La identificación mediante los genes ITS, para las cepas de *Rhizoctonia solani*, no coinciden con lo observado en la caracterización morfológica, ya que los datos brindados por el BLAST, muestra géneros pertenecientes al grupo de ascomicetes específicamente *Colletotricum cliviae* y *Cladosporium* sp.; además, las cepas no poseen las características de estos géneros al comparar la información (Anexo 1.). Por otro lado, la información brindada por los cromatogramas muestra alteraciones, por lo que se presume hubo errores metodológicos en su preservación y el mantenimiento no fue el adecuado, a diferencia de las otras especies utilizadas en esta investigación (Cuadro 5.).

En cuanto a las metodologías N°1 y N°2 propuestas por Singleton *et al.* (1993), previstas para la multiplicación de inóculo presentaron inconvenientes en aspectos metodológicos, ya que los autores no indican datos importantes, como la temperatura y la humedad favorables para el desarrollo de las colonias, por lo que exigieron pruebas preliminares para realizar la multiplicación de inóculo. En ambas metodologías se produjo poco micelio, por lo que los granos no se colonizaron por completo, lo que impidió que se produjera el suficiente inóculo. Otra limitante presentada fue la duración del período de incubación necesario para la producción de dicho inóculo, el cual se extendió hasta por 30 días, el doble que reportaban los procedimientos seguidos. Una seria limitante que presentaron las metodologías N°1 y N°2 fue la facilidad con la que se contaminaban con bacterias y levaduras, razón por la cual se debió repetir en varias oportunidades el procedimiento, sin éxito en la propagación adecuada del inóculo.

Varios autores señalan que, la temperatura adecuada para las especies de *Fusarium* es entre 20 – 25° C (Carling y Summer 1992, Summerell *et al.* 2003 y Leslie y Summerell 2007). De la misma manera, los autores no indican un porcentaje de humedad o agua requerida para un adecuado desarrollo del hongo en condiciones de laboratorio. Según Ploetz (1993), *Fusarium* es un organismo aerobio, por lo que condiciones excesivas de agua supondría una reducción de su población en condiciones de suelo. Sin embargo, el uso de matrices de vidrio evitaría una adecuada oxigenación del organismo, además, de un intercambio con la humedad del ambiente, ya que al agregar el agua el resultado en el crecimiento de las cepas fue positivo.

A partir de las observaciones realizadas para las metodologías anteriores, se procedió a modificar la metodología N°3 (Pérez *et al.* 2013). De esta manera se agregó agua destilada estéril a los granos de arroz, mezcla que luego sería autoclavada. De esta forma se produjeron resultados positivos para el desarrollo de las colonias, con una abundante producción de micelio y conidios, sin organismos contaminantes y en un periodo de incubación de 15 días, por lo que fue seleccionada para la producción de inóculo a utilizar en la prueba de patogenicidad de las cepas tanto de *Fusarium oxysporum* como *Fusarium solani*.

Esta metodología no era la adecuada para las cepas identificadas como *Rhizoctonia solani* ya que este hongo no se desarrolló en las metodologías anteriores. Por lo tanto, se utilizó otra metodología específica para el género de Ruppel *et al.* (1979), la cual utiliza cebada en lugar de arroz, donde al inocularse la cebada autoclavada y agregando agua el crecimiento micelial fue de aproximadamente una semana.

Con base en los resultados obtenidos, el porcentaje de incidencia luego de ocho semanas después de la inoculación en vivero fue de 100%, es decir, todas las plantas incluidas en la investigación presentaron síntomas, exceptuando el testigo.

Los síntomas recuperados de las plantas evaluadas en vivero coinciden con los síntomas observados en campo, lo cual esto comprueba la patogenicidad para las plantas del subgrupo Cavendish variedad “Enano ecuatoriano”, por parte de los organismos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el nivel de severidad presentado por las raíces de las plantas en vivero es mucho mayor a las presentadas en campo, debido al desarrollo radical de las plantas en vivero y al alto nivel de inóculo utilizado.

La sintomatología observada en las plantas inoculadas con las cepas de *Fusarium oxysporum* concuerda con los síntomas reportados por varios autores. Por ejemplo, Ammar (2007), en pruebas con variedades de banano del subgrupo Cavendish, el cual aisló diferentes especies de *Fusarium* de plantas que presentaban síntomas y los sometió a pruebas de patogenicidad, y concluyó que los síntomas coincidían con el organismo *Fusarium oxysporum*. Estos síntomas coinciden con los presentados por la mayoría de los tratamientos en la fase de campo.

Asimismo, Trigiano *et al.* (2008), señalan a organismos como *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* como agente causal de daño vascular. Este hongo se desarrolla de forma interna en el haz del xilema; al producir enzimas pectolíticas en las células del parénquima generan mucílagos o formación de tálides, causa obstrucción del paso y del contenido de los haces del xilema hacia la parte aérea, interviniendo en el proceso de fotosíntesis de la planta ocasionando una clorosis intervenal en las hojas.

Por otro lado, Ploetz (2015), indicó que organismos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, conocido por ser uno de los hongos fitopatógenos más importantes en la producción bananera, afecta directamente el xilema impidiendo el paso de agua, mientras que el daño producido genera una zona de avance rojiza-marrón producto de fitotoxinas producidas por el patógeno. Además, el amarillamiento o clorosis en las hojas que puede o no presentarse, a pesar del daño en la zona radical.

Las cepas de *Fusarium oxysporum* 7T y 4T, presentaron mayor presencia de daño; la evolución de los síntomas produjo la pérdida de plantas en pocas semanas en las que 4T y 7T obtuvieron una pérdida de 65% y 80% de las plantas, respectivamente (Figura 11).

Jonkers *et al.* (2009) citado por Michielse y Rep (2009), mostraron que es necesario la producción de varias enzimas de degradación de la pared celular, para una colonización de la raíz, así como, para la penetración de esta, los cuales dependen de la asimilación de ácidos orgánicos, aminoácidos y polisacáridos. Lo anterior podría explicar el comportamiento en las cepas de la especie *Fusarium oxysporum*, ya que los genes involucrados en su patogenicidad podrían variar en cada una de las cepas determinando su capacidad de infección, facilitando o desfavoreciendo el ingreso a la planta.

Al respecto Dita *et al.* (2018), informan que los genes implicados en patogenicidad de *Fusarium oxysporum* conocidos como SIX (Secreted in Xylem), varían según la raza de FOC, ya que, para la raza 4 estaban presentes los genes SIX1, SIX7 y SIX8, mientras que para la raza 1 únicamente se presentaba SIX1; en contraste, para una cepa no patogénica no había rastro de los genes.

De la misma manera, la cepa 1T identificada como *Fusarium solani* mostró resultados positivos en la prueba de patogenicidad, a pesar de que el daño radical se ha asociado a otras especies como *Fusarium oxysporum* en plantas de banano, Jones (1995), reporta a los organismos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia* spp. como agentes causales de la pudrición radical en plantas de banano y plátano. También, se reporta a *Haematonectria haematococca* (nombre que anteriormente se le daba al estado sexual de *Fusarium solani*) como agente causal de podredumbre seca en plantas de banano. Las plantas inoculadas con la cepa 1T mostraron lesiones de forma tardía e inclusive el tratamiento presentó una baja mortalidad al final de la etapa de campo, demostrando un baja agresividad con respecto a las especies de *Fusarium oxysporum* (Ploetz 2003, CAB International 2017).

Otros autores han asociado a la especie *Fusarium solani* como hongo endófito de plantas de banano. Latiffah Zakaria y Nur Hidayan (2011), obtuvieron esta especie en 32% de los aislamientos realizados, únicamente superado por la especie *Fusarium oxysporum* (42%). Por otra parte, Ahtman (2006), señala que estas dos especies fueron las que predominaron en la obtención de endófitos provenientes de variedades de Cavendish.

Por otro lado, síntomas similares se describen para organismos pertenecientes al género *Rhizoctonia* el cual, produce coloraciones marrones y rojizas, en lesiones radicales. Al aumentar el daño en la zona radical hay un debilitamiento y clorosis, lo que puede provocar la muerte de la planta (Agris 2005).



*Rhizoctonia solani*, ha sido reportado como especie fitopatógena para banano en etapa de aclimatación en plantas de banano en Egipto por Abdel-Kader *et al.* (2004), sin embargo, el organismo fue identificado únicamente por técnicas morfológicas.

En el 2008 se reportó el organismo *Rhizoctonia fragariae* como organismo causante de necrosis y pudrición del cormo en plantas de banano en fase de vivero (Pérez Vicente *et al.* 2008), mientras que se reportaba a *Ceratobasidium* sp. (nombre que se le daba al estado sexual de *Rhizoctonia* anastomosis grupo F), como causante de lesiones radicales en cultivares de banano tales como 'Goldfinger' (AAAB) y 'Manzano' (AAB) en un programa de investigación en la Universidad de Georgia (Yin *et al.* 2011).

Las cepas identificadas como *Rhizoctonia solani* (3T y 11T), difirieron en su capacidad de infección. La cepa 3T de *Rhizoctonia solani* mostró ser más agresiva ya que, las plantas inoculadas con esta cepa presentaron síntomas de forma muy rápida, a los tres días después de la inoculación, e incluso alcanzó el porcentaje de mortalidad más alto con respecto a los demás tratamientos (Figura 11). Dubey *et al.* (2012), explican que las especies de *Rhizoctonia solani*, al ser consideradas un complejo de especies, muestran gran variabilidad en sus características morfológicas, fisiológicas y en el grado de patogenicidad proveniente de los diferentes grupos de anastomosis.

Es importante mencionar que además de las cepas inoculadas se recuperaron otros hongos, entre los más frecuentes *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. y *Cladosporium* sp. Se debe acotar también que estos organismos se aislaron tanto plantas expuestas a las cepas por evaluar como de las plantas sin inoculación (Testigo). Esto puede deberse a que, al estar el sustrato desinfectado permitiera el desarrollo de poblaciones de hongos presentes en el vivero, debido a que estas instalaciones solo cuentan con una malla de

sarán como techo y no hay paredes, lo que facilita el ingreso y dispersión de esporas de hongos oportunistas provenientes de sitios cercanos.

Otra posible causa de la aparición de organismos diferentes a los inoculados es que estos sean hongos endófitos de banano, los cuales ya han sido reportados previamente, Por ejemplo Cao *et al.* (2002), encontraron colonias de *Fusarium* spp. en 10% de los aislamientos realizados provenientes de raíces sanas, en el sur de China para la especie *Musa acuminata*.

Tomando en cuenta los períodos de déficit hídrico y al mismo tiempo los períodos de lluvias fuertes en la zona, estos factores probablemente predispusieron a la planta al ataque de los organismos evaluados. Por el contrario, las plantas testigo a pesar de haber recibido condiciones hídricas desfavorables lograron recuperarse y mantenerse sanas hasta el final de la investigación (Figura 12).

Los análisis realizados a las cepas recuperadas de las pruebas de patogenicidad mediante el gen de factor de elongación coinciden con la identidad asignada mediante la descripción morfológica y molecular que se les proporcionó a las cepas originales estudiadas. De hecho, el gen de factor de elongación 1-alpha es uno de los genes más utilizados para la identificación de organismos del género *Fusarium* (Porter *et al.* 2015).

La información generada muestra que los organismos relacionados a la pudrición radical en plantas de banano son capaces de infectar de forma independiente, es decir, estos organismos poseen mecanismos patogénicos capaces de sobrepasar las defensas de la planta e irrumpir en la zona radical. No obstante, las condiciones en las plantaciones

comerciales no se limitan a las propuestas en esta investigación e incluyen más variables que interaccionan día a día con el cultivo.

A pesar de que el banano Cavendish reemplazó el cultivar “Gros Michel” debido a su resistencia a la enfermedad llamada pudrición por *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 1, hay que tomar en cuenta la susceptibilidad del banano Cavendish al daño del nematodo barrenador *Radopholus similis* y al pobre desarrollo radical que genera (Dinesh *et al.* 2014), además agregando la presencia de estos organismos asociados al deterioro radical, la combinación de estos factores supondría un serio problema en las principales zonas productoras del país (Alfaro *et. al.* 2018).

## VI. Conclusiones

- La identificación de aislamientos indicó la presencia de al menos tres especies de hongos patógenos de suelo, pertenecientes al complejo de especies de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, con cepas diferentes según morfología, asociados al deterioro radical en plantaciones de banano en la zona de Sarapiquí.
- Se observaron diferencias morfológicas y de patogenicidad entre las cepas aisladas *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.
- Se determinó que los aislamientos realizados generan síntomas de deterioro del sistema radicular bajo condiciones semi controladas en vivero y por lo tanto son parte de los agentes causales del problema fitosanitario.

## VII. Recomendaciones

- Realizar un muestreo en las diferentes fincas, en las áreas con baja y alta productividad en comparación a la frecuencia de aparición del deterioro radical y la presencia de los organismos identificados en esta investigación para determinar el grado de pérdida económica del problema.
- Realizar un ensayo de inoculación de plantas en vivero con mezclas de las diferentes cepas de las tres especies identificadas, en vista que el resultado final, el deterioro radicular, puede ser producto del ataque combinado de las diferentes cepas.
- Investigar la interacción de los patógenos descritos con otros organismos, especialmente el nematodo barrenador *Radopholus similis*, así como con organismos endófitos.
- Se recomienda realizar una identificación molecular mediante *primers* específicos para verificar si las cepas clasificadas como *Fusarium oxysporum* poseen alguna relación con la forma especial *cubense*

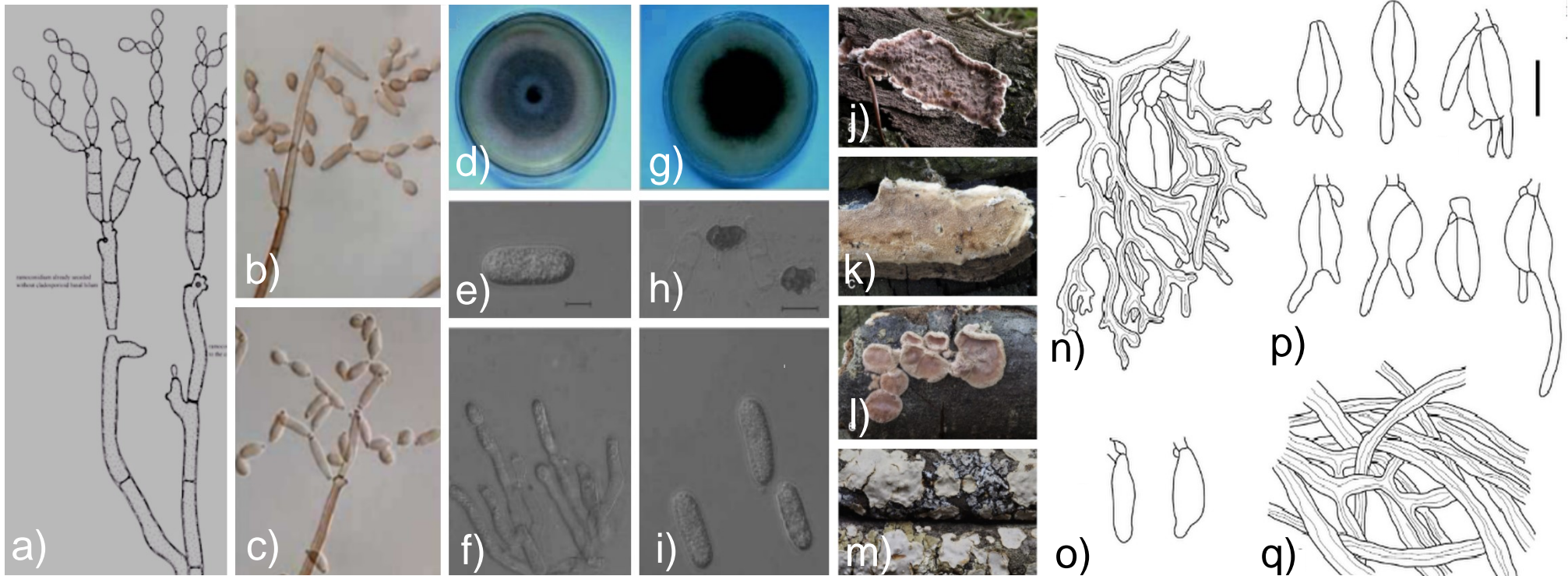
- En cuanto al manejo se recomienda utilizar organismos antagonistas como combate biológico específicamente hongos como *Gliocladium* sp., *Trichoderma* sp., o bacterias como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces griseovirides*. Además, se recomienda realizar pruebas de campo con el suministro de materia orgánica disponible en la zona, con el fin de promover un crecimiento balanceado de la microbiota del suelo y atenuar o suprimir el crecimiento de patógenos en el suelo.
- Tomar en cuenta el uso de material orgánico en campo y en vivero, que pueda favorecer el desarrollo de organismos benéficos como los mencionados anteriormente para un buen establecimiento de estos.
- Considerar en la nutrición del cultivo aplicaciones de nutrimentos como Boro, Níquel, Hierro, Silicio y Nitratos, los cuales, pueden tener un impacto en la reducción de enfermedades de tipo radical con los géneros identificados en esta investigación.
- Realizar un monitoreo anual del nivel de acidez en el suelo, ya que un pH bajo tiene un efecto en la nutrición de la planta y favorece la incidencia de enfermedades radicales en el cultivo.

## VIII. Anexos

Anexo 1. Información de los organismos identificados en la prueba molecular mediante ITS para las cepas 3T, 7T y 11T.

Nombre del organismo*	Cepa con la que se identifica**	Filo	Micelio		Conidióforo	Conidio		Cuerpos fructíferos
			Tipo	Coloración en medio de cultivo		Tipo	Forma	
<i>Colletotricum cliviae</i> (Yang <i>et al.</i> 2009).	3T	Ascomycota	Septado e hialino.	PDA: Blanco a gris con la edad, con los bordes blancos, al reverso con tonos café oscuro a verde oscuro.	Hialinos, ramificados o no ramificados 18- 36.5 × 4-6.5 μm	Ameroconidios (aseptados)	Hialinos, lisos y cilíndricos o levemente curvados en los extremos. 15-24 × 4.5-6.5 μm	Conidioma: acérvulo con setas, con masas de conidios de coloración amarillo pálido. Setas: 75-105 × 4-6 μm Ascomas: No producido en medio de cultivo.
<i>Cladosporium</i> sp. (Bensch <i>et al.</i> 2012).	11T	Ascomycota	Septado, subhialino o levemente pigmentado o pigmentado (café oscuro).	PDA: Coloración verde olivo, gris o negro parduzco.	Solitarios o ramificados, cilíndricos, subcilíndricos o filiformes. Algunas especies pueden producir conidióforos dimórficos	Ameroconidios (aseptados) y fragmoconidios (dos o más septos longitudinales) subhialinos o pigmentados, solitarios o producidos en cadenas.	Variable: Subglobosa, ovoide, elipsoide, fusiforme, o cilíndrica. Verrugosos o lisos. La mayoría de los conidios poseen <i>hilum</i> que se conoce como una cicatriz en la base de este.	Ausencia de conidioma <i>In vitro</i>  Formación de estructuras inmaduras o estériles, similares a pseudotecios ( <i>Pseudotecio-like</i> )
Orden Auriculariales (Malysheva y Spirin 2017).	7T	Basidiomycota	Septado, formación de fíbulas. Hifas delgadas que se vuelven gruesas según la edad. Algunas especies pueden producir cistidios que pertenece al himenio.	Hialina o coloración café oscura.	***Basidios: elipsoide u ovoides. Septados longitudinalmente.	Aseptados	***Basidiosporas: hialinas, cilíndricas o con los extremos levemente curvados.	Basidiocarpo gelatinoso, en forma de orejas, coloración variable según la especie.

\*Imagen del organismo (Anexo 2). \*\*Comparar información brindada con los resultados obtenidos en la sección A). \*\*\*Estructuras producidas en fase sexual.



Imágenes obtenidas de: a), b) y c) (Bensch et al. 2012). d), e), f), g), h) e i) (Yang et al. 2009). j), k), l), m), n), o), p) y q), (Malysheva y Spirin 2017).

Anexo 2. Estructuras de los organismos *Cladosporium* sp., a), b) y c) Conidióforo y conidios en cadena. *Colletotricum cliviae* d) Coloración del cultivo arriba, g) Coloración del cultivo por abajo, e) Conidio cilíndrico, h) conidios con apresorios, f) conidióforos ramificados, i) conidio con puntas levemente curvadas. j), k), l) y m) Basidiocarpos de cuatro especies pertenecientes al grupo de los Auriculariales. Estructuras para la identificación de especies de Auriculariales n) himenio, o) cistidio p) basidios y q) hifas.



## IX. Literatura consultada

- Abdel-Kader, MM; El-Bahr, MK; El-Mougy, NS. 2004. Pathogenic Fungi and Soil Conditions Causing Root Rot and Wilt Disease Complex during Acclimatization of Tissue Culture-Derived Banana Plantlets. 32(1): 37-48.
- Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. 5th ed. San Diego, California, Elsevier Academic Press, 948.
- Ajayi-Oyetunde, OO; Bradley, CA. 2018. *Rhizoctonia solani*: Taxonomy, population biology and management of Rhizoctonia seedling disease of soybean. Plant Pathology 67(1): 3-17.
- Alfaro, F; Sánchez, M; Carr C; Guzmán, M. 2018. Interacción entre *Radopholus similis* y el marchitamiento por Fusarium en banano Gros Michel. XXII Congreso Internacional ACORBAT, Miami, Florida, USA.
- Ammar, MI. 2007. *Fusarium* species associated with corm rots and wilt of banana (*Musa* sp.) under Egyptian Conditions. Egypt. J. Phytopathology, 35 (2) 81-98.
- Arauz, F. 2011. Fitopatología: Un enfoque agroecológico. Segunda Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 105.
- Bensch, K; Braun, U; Groenewald, JZ; Crous, PW. 2012. The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology 72: 1-401.
- Booth, C. 1971. The Genus Fusarium. CAB International, Surrey, England. 237.
- Booth, C; Stover, RH. 1974. *Cylindrocarpon musae* SP.NOV., commonly associated with burrowing nematode (*Radopholus similis*) lesions on bananas. Transactions British Mycological Society. 63(3) 503 – 507.
- CAB International. 2017. Consultado 24 oct. 2018. Disponible en <https://www.cabi.org/isc/datasheet/35124> (Musa (banana) Datasheet: List of pests).
- CAB International. 2018. Consultado 7 abr. 2018. Disponible en [www.cabi.org](http://www.cabi.org) (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Panama disease of banana) In: Invasive Species Compendium).

- Cao, LX; You, JL; Zhou, SN. 2002. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(2): 169-171.
- Carling, D; Summer, DR. 1992. *Rhizoctonia*. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. APS Press, p.157-165p.
- Carr, C; Sánchez, M; Alfaro, F; Villalta, R; Sandoval, J; Guzmán, M. 2017. Marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá del banano y otras musáceas. Corporación Bananera Nacional (CORBANA). Dirección de Investigaciones: Sección de Fitopatología. Hoja Divulgativa N°11. Enero.
- Corporación Bananera Nacional. 2016. Estadísticas Bananeras. Página en línea consultada el 13 noviembre de 2016. Disponible en <https://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananeras>
- Cortés, G. 1994. Atlas agropecuario de Costa Rica. EUNED. San José, Costa Rica. 513.
- Cubeta, MA; Vilgalys, R. 1997. Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. *The American Phytopathological Society (APS)* 87(4): 480-484.
- Dam, P. Van; Fokkens, L; Ayukawa, Y; Gragt, M. Van Der; Horst, A; Brankovics, B; Houterman, P.M; Arie, T; Rep, M. 2017. A mobile pathogenicity chromosome in *Fusarium oxysporum* for infection of multiple cucurbit species. *Nature: Scientific Reports*. 7: 15.
- Dinesh, BM; Ravichandra, NG; Reddy, BMR; Somasekhara, YM. 2014. Interactions between *Radopholus similis* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing wilt Complex on Banana. *International Journal of Advanced Research* 2(9): 976-985.
- Dita, M; Barquero, M; Heck, D; Mizubuti, ESG; Staver, CP. 2018. *Fusarium* Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Frontiers in Plant Science*. 9(10): 1-21.
- Dubey, SC; Priyanka, K; Singh, V. 2014. Phylogenetic relationship between different race representative populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in respect of translation elongation factor - 1  $\alpha$ ,  $\beta$  - tubulin, and internal transcribed spacer region genes. *Arch. Microbiol.* 196: 445-452.

- Dubey, SC; Tripathi, A; Upadhyay, B.K. 2012. Molecular diversity analysis of *Rhizoctonia solani* isolates infecting various pulse crops in different agro-ecological regions of India. *Folia Microbiologica*. 56 (7). 513 – 524.
- Dutta, S; Tarafder, M; Islam, R; Datta, B. 2018. Characterization of cellulolytic enzymes of *Fusarium* soil Isolates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14(3): 279-285.
- Erper, I; Kilicoglu, MC; Turkkan, M; Onder, H. 2016. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from winter squash in the Black Sea region of Turkey. *European Journal of Plant Pathology* 2016: 683-697.
- Farr, DF; Rossman, AY. 2018. United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service. Consultado 8 mayo 2018. Disponible en <https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases> (Fungal Databases, U.S.National Fungus Collections, ARS, USDA).
- González, V; Portal, MA; Rubio, V. 2006. Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4(1): 55-79.
- Guillemaut, C; Edel-Hermann, V; Camporota, P; Alabouvette, C; Richard-Molard, M; Steinberg, C. 2003. Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. *Can. J. Microbiol.* 49: 556-568.
- Hafizi, R; Salleh, B; Latiffah, Z. 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(3): 959-968.
- Index Fungorum. 2018. Consultado 7 abr. 2018. Disponible en <http://www.indexfungorum.org> (*Fusarium* y *Rhizoctonia*).
- Jones, DR. 1995. Diseases of banana and plantain. The American Phytopathological Society. Consultado 24 oct. 2018. Disponible en <https://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/BananaandPlantain.aspx> (Diseases of banana and plantain).
- Jonkers, W; Rodrigues, CDA; Rep, M. 2009. Impaired Colonization and Infection of Tomato Roots by the  $\Delta$  frp1 Mutant of *Fusarium oxysporum* Correlates with Reduced CWDE Gene Expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(5): 507-518.

- Kiliçoğlu, MÇ; Özkoç, I. 2010. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* AG4 using PCR-RFLP of the rDNA-ITS region. Turk. J. Biol. 34: 261-269.
- Latiffah Z; Nur H. 2011. Endophytic *Fusarium* spp. from wild banana (*Musa acuminata*) roots. African Journal of Microbiology Research 5(21): 3600-3602.
- Leslie, JF; Summerell, BA. 2007. The *Fusarium* Laboratory Manual. Primera edición, Blackwell Publishing. Iowa, Estados Unidos. 388.
- Lübeck, M; Poulsen, H. 2001. UP-PCR cross blot hybridization as a tool for identification of anastomosis groups in the *Rhizoctonia solani* complex. FEMS Microbiology Letters 201(1): 83-89.
- Ma, LJ; Geiser, DM; Proctor, RH; Rooney, AP; O'Donnell, K; Trail, F; Gardiner, DM; Manners, JM; Kazan, K. 2013. *Fusarium* pathogenomics. Annual review of microbiology 67: 399-416.
- Malysheva, V; Spirin, V. 2017. Taxonomy and phylogeny of the Auriculariales ( Agaricomycetes , Basidiomycota ) with stereoid basidiocarps. British Mycological Society 121(8): 689-715.
- Michielse, CB; Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Pathology 10(2): 311-324.
- Moreira, F; Jeroen, E; Bignell, D. 2011. Manual de biología de suelos tropicales. 1ra edición, México. 243.
- Mycobank. 2018. Consultado 7 abr. 2018. Disponible en <http://www.mycobank.org> (*Fusarium* y *Rhizoctonia*).
- Nelson, PE; Dignani, MC; Anaissie, EJ. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clinical microbiology reviews 7(4): 479-504.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and Pathogenicity of Anastomosis and Intraspecific Groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Annual Review of Phytopathology 25: 125-143.
- Ortiz, R; Swennen R. 2014. From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. Biotechnology Advances. 32: 158-169.

- Pérez, L; Batte, A. 2002. A Study of endophytic fungal species associated with root necrosis of banana in banana and plantain plantations in Cuba. *Informusa: The internacional Magazine on banana and plantain* 11 (1) 23-25.
- Pérez, L; Martínez, E; Gonzáles, M. 2008. Necrosis de raíces y pudrición del cormo por *Ceratobasidium* sp. AG-G (*Rhizoctonia fragariae*) en vitroplantas de *Musa* en fase de vivero. *CORBANA*. 34(61): 55-56.
- Pérez, R; Tapia, A; Soto, G; Benjamin T. 2013. Efecto del Bio-carbón sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y el desarrollo de plantas de banano (*Musa* AAA). *Revista Intersedes* 14 (27) 66-78.
- Perry, RN; Moens, M. 2006. *Plant Nematology*. CAB International. Primera edición. Londres, Inglaterra 463.
- Pineda, J; Hernández, A; González, A; Barrientos, V; Nass, H; Gil, E. 2005. Técnica de inoculación rápida y eficiente para la evaluación de materiales de maíz ante *Rhizoctonia solani* kühn. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela Bioagro, (17) 93-98. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85717204>
- Ploetz, RC. 1993. *Fusarium* wilt of banana. Segunda edición. The American Phytopathological Society (APS), Minnesota, Estados Unidos. 140.
- Ploetz, RC. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. 1ra edición, Londres, CAB International, 527.
- Ploetz, RC. 2010. *Diseases of banana, abacá, and enset: Fungal Diseases of the Root, Corm and Pseudostem*. CAB International. 143-164.
- Ploetz, RC. 2015. Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection* 73: 7-15.
- Porter, LD., Pasche, JS., Chen, W., and Harveson, R. M. 2015. Isolation, identification, storage, pathogenicity tests, hosts, and geographic range of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* causing *Fusarium* root rot of pea. *Plant Health Progress*. 16 (3). 136-145
- Ruppel, EG; Schneider, CL; Hecker, RJ; Hogaboam, GJ. 1979. Creating epiphytotics of *Rhizoctonia* root rot and evaluating for resistance to *Rhizoctonia solani* in sugarbeet field plots. *Plant Disease Reporter* 63: 518-522.

- Sandoval, JA; Muller, L. 1999. Anatomía y Morfología de la planta de banano (*Musa AAA*). CORBANA 24(51): 43-60.
- Saparrat, MCN; Martínez, M.; Tournier, HA; Cabello, MN; Arambarri, AM. 2000. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrata. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16(8-9): 799-803.
- Schadeck, S; Risede, J; Delvaux, B. s.f. Banana root rot disease caused by *Cylindrocladium* sp. As related to soil type. Université Catholique de Louvain, Symposium N° 41, Bélgica.
- Schmale III, DG; Bergstrom, GC. 2003. *Fusarium* head blight in wheat. The American Phytopathological Society. Consultado 29 abr. 2018. Disponible en <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Fusarium.aspx>
- Sikora, RA; Pocasangre, L; Zum Felde, A; Niere, B; Vu, T; Dababat, A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and *in-plant* suppressiveness to plant parasitic nematodes. Biological Control 46 (1): 15-23.
- Simmonds, NW. 1960. Bananas. s.l., s.e., 466.
- Singleton, L; Mihail, J; Rush, C. 1993. Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi.
- Sneh, B; Burpee, L; Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. The American Phytopathological Society (APS), Minnesota, Estados Unidos. 133.
- Soto, M. 2014. Bananos: Conceptos básicos. 1ra edición. Tecnológica de Costa. Cartago, Costa Rica. 336.
- Summerell, BA; Salleh, B; Leslie, J.F. 2003. A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. Plant Disease 87(2): 117-128.
- Sutherland, R; Viljoen, A; Myburg, AA; Van den Berg, N. 2013. Pathogenicity associated genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. South African Journal of Science 109(5): 1-10.
- Taylor, A; Vágány, V; Jackson, AC; Harrison, RJ; Rainoni, A; Clarkson, JP. 2016. Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Molecular Plant Pathology 17(7): 1032-1047.

- Tredway, LP; Burpee, L. 2001. *Rhizoctonia* diseases of turfgrass. The Plant Health Instructor. The American Phytopathological Society. Consultado 7 mayo 2018. Disponible en <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/Rhizoctonia.aspx>
- Trigiano, RN; Windham, MT; Windham, AS. 2008. Plant Pathology: concepts and laboratory exercises. Taylor & Francis Group, 2da edición. Florida, Estados Unidos. 558.
- Tropicos.org. 2018. Consultado 14 agosto 2018. Disponible en <http://tropicos.org/> (Nombres científicos y autoridades).
- Turner, DW; Rosales, FE. Banana Root System: towards a better understanding for its productive management. Montpellier, France, 251.
- Yang, YL; Liu, ZY; Cai, L; Hyde, KD; Yu, ZN; McKenzie, EHC. 2009. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. Fungal Diversiy 39: 123-146.
- Yin, J; Koné, D; Cubeta, MA; Burpee, L.; Fonsah, EG; Csinos, AS; Ji, P. 2011. First Report of Root Rot Caused by Binucleate *Rhizoctonia* Anastomosis Group F on *Musa* spp. The American Phytopathological Society 95(4): 490.