

Respuesta de plantas M₁V₅ de banano cv. 'Gran Enano' tratadas con etil metano sulfonato o azida de sodio, a la infección por *Pseudocercospora fijiensis* M.

Manuela García Hernández

Tesis para optar por el grado de licenciado en ingeniería agronómica

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias Agroalimentarias

Escuela de Agronomía

2023

Respuesta de plantas M₁V₅ de banano cv. 'Gran Enano' tratadas con etil metano sulfonato o azida de sodio, a la infección por *Pseudocercospora fijiensis* M.

Manuela García Hernández

Tesis para optar al título profesional de Ingeniera Agrónoma con el grado de licenciada en Agronomía


M.Sc. Álvaro Azofeifa Delgado

DIRECTOR DE TESIS


M.Sc. Oscar Castro Zúñiga

MIEMBRO DEL TRIBUNAL


Ph.D. Jorge Sandoval Fernández

MIEMBRO DEL TRIBUNAL


Ph.D. Mauricio Serrano Porras

MIEMBRO DEL TRIBUNAL


Ph.D. Luis Gómez Alpizar

DIRECTOR DE LA ESCUELA


B.Sc. Manuela García Hernández

SUSTENTANTE

Agradecimientos

A la Universidad de Costa Rica, en especial a la Escuela de Agronomía, porque ha sido mi segundo hogar durante todo este tiempo y gracias a la excelente educación que he recibido, me siento confiada para iniciar las nuevas etapas que están por venir.

Le agradezco al M.Sc. Álvaro Azofeifa, ya que gracias a su interés en mi propuesta de investigación y a su guía, se logró concretar con el tema de la presente investigación. Además, agradecer su apoyo constante durante las distintas fases del ensayo. ¡Muchas gracias profe!

Al estimado Dr. Jorge A. Sandoval, por también interesarse en la investigación y apoyarla desde un inicio a través de sus valiosos consejos, recomendaciones y por su tiempo y disposición al formar parte del comité evaluador.

A la Corporación Bananera Nacional por permitirme establecer el ensayo en sus instalaciones, brindarme el material vegetal y el apoyo económico para realizar el proyecto. A sus funcionarios Silvia Masis, Nancy Chaves, Fabiola Alfaro, Randy Villalobos y don Rodolfo Álvarez, por ayudarme en distintas labores, compartir conmigo su conocimiento y aclararme dudas que surgían durante las distintas fases de la investigación.

Al laboratorio de biotecnología del CIGRAS. Por facilitarme espacio, materiales y apoyo brindado. En especial a Paula Carvajal, Andrea Holst, Laura Vega y los asistentes Joseph Chinchilla, Jéssika Torres y Anghelo Herrera. Gracias a su ayuda en el laboratorio pude concluir satisfactoriamente esta investigación.

A los miembros revisores de esta investigación, M.Sc. Oscar Castro y el Dr. Mauricio Serrano. Gracias a ambos por su tiempo y gran disposición a la hora de aclararme dudas, además de sus valiosos consejos que me quedaron grabados a lo largo de mi carrera profesional. Fue un placer ser alumna de ustedes.

A mis amigas y colegas Ali, Andre, Jime, Kath y Pri, que a lo largo de la carrera hemos compartido enseñanzas, risas, llanto y mucho más. Gracias por haber sido un apoyo tan grande. Ha sido un placer coincidir durante esta etapa.

A mis padres Paula y Marcos. No tengo palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí, por el apoyo incondicional a lo largo de mi vida y gracias a sus enseñanzas me encuentro aquí finalizando esta etapa. Gracias por todo, los amo.

RESUMEN

Se realizó un estudio en banano (*Musa AAA*) subgrupo Cavendish, cv. 'Gran Enano', donde se determinó la frecuencia de plantas variantes generadas a partir del tratamiento con los agentes mutagénicos etil metano sulfonato o azida de sodio a nivel *in vitro*. Además, se evaluó la respuesta en condiciones de campo, de plantas M₁V₅ ante la exposición a inóculo natural de *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, principal enfermedad foliar que afecta al cultivo.

Se realizaron las aplicaciones de los tratamientos etil metano sulfonato (EMS) a 0,15M/ 6h (solución mutagénica), buffer pH7 (B. pH7) a 0,1M/6h (control), azida de sodio (AS) a 0,003M/1h (solución mutagénica), buffer pH4 (B. pH4) a 0,1M/3h (control) y agua (testigo). Luego, los materiales fueron aclimatados y trasladados a campo para evaluar la respuesta a *P. fijiensis*.

A nivel *in vitro*, en el primero de los subcultivos, se observó que las soluciones mutagénicas generaron una mayor afectación, reflejada en menor sobrevivencia, EMS (24%) y AS (82%), mientras que los controles buffer y el testigo obtuvieron 100%. Tras obtener la M₁V₅, la altura de los explantes fue de 1,7 cm y 2,9 cm, para el EMS y la AS, respectivamente, 3,8 cm para el buffer pH 7, 3,9 cm para el buffer pH 4 y 4,0 cm para el testigo. En cuanto a la frecuencia de plantas variantes, el EMS generó un 34% y la AS 5%, en el caso de los controles buffer pH 7 y pH 4, además del testigo, no se generaron plantas variantes.

Al final de la prueba, se seleccionaron 178 plantas con menor susceptibilidad al daño por *P. fijiensis*. Esta población se agrupó en cuatro cuartiles según grado de severidad hacia Sigatoka negra. De estos se destaca el primer cuartil presentando valores de ABCDE desde 61 hasta 101. De estas plantas seleccionadas, un 80% se generó a partir del tratamiento con AS, un 9% al EMS, B. pH 7 (4%), B. pH4 (3%) y del testigo 3%.

Palabras clave: *Musa*, *Gran Enano*, *Sigatoka negra*, *mutación*, *mutagénesis química*, *resistencia a patógenos*.

Índice de contenido

1	Introducción	8
2	Objetivos	10
2.1	Objetivo general.....	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	Revisión de literatura	11
3.1	Aspectos generales del cultivo de banano (<i>Musa AAA</i>).....	11
3.2	Ploidía de banano (<i>Musa AAA</i>) cv. ‘Gran Enano’	11
3.3	Principales enfermedades que afectan al cultivo	12
3.4	Sigatoka negra (<i>Pseudocercospora fijiensis</i> M.)	13
3.5	Combate y monitoreo de Sigatoka negra	14
3.6	Mejoramiento genético en banano	15
3.7	Micropropagación <i>in vitro</i> como herramienta en programas de mejoramiento genético.	16
3.8	Mutagénesis	17
4	Metodología	20
4.1	Localización.....	20
4.2	Material experimental	20
4.3	Procedimiento general	20
4.3.1	Aplicación del agente mutagénico y subcultivo <i>in vitro</i> de las plantas hasta M ₁ V ₅ . 20	
4.3.2	Aclimatación de materiales de banano (<i>Musa AAA</i>).	21
4.3.3	Determinación de la respuesta de plantas M ₁ V ₅ ante la exposición a inóculo de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	22
4.4	Diseño experimental	23
4.4.1	Determinación a nivel <i>in vitro</i> de plántulas variantes y su correlación respecto al agente mutagénico aplicado.	23
4.4.2	Evaluación de la respuesta de plantas M ₁ V ₅ ante la exposición a inóculo de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	24
4.5	Análisis de datos	25
5	Resultados	27
5.1	Determinación a nivel <i>in vitro</i> de plántulas variantes y su correlación respecto al agente mutagénico aplicado.....	27
5.2	Respuesta de plantas de banano tras exposición a inóculo de <i>P. fijiensis</i>	32

6	Discusión.....	40
6.1	Determinación de plántulas variantes y su correlación respecto al agente mutagénico aplicado.	40
6.2	Respuesta de plantas de banano tras exposición a inóculo de <i>P. fijiensis</i>	43
7	Conclusiones	47
8	Referencias bibliográficas	48
9	Anexos.....	58

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Descripción de los tratamientos aplicados a explantes de banano cv. ‘Gran Enano’. Laboratorio del Centro de Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica.2021.	23
Cuadro 2.	Variables y descripción de parámetros para considerar plantas de banano cv. ‘Gran Enano’ susceptibles a Sigatoka negra (<i>Pseudocercospora fijiensis</i> M.), según los días después de exposición a inóculo (ddi). Corporación Bananera Nacional, La Rita, Pococí, 2022.	25
Cuadro 3.	Porcentaje de sobrevivencia (%) en explantes de cv. ‘Gran Enano’ in vitro, al primer subcultivo posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y el tratamiento testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021.	27
Cuadro 4.	Porcentaje de plantas variantes (%) de banano cv. ‘Gran Enano’, en condiciones de invernadero, tras cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH 4) y testigo de agua. Corporación bananera Nacional. 2022.	32
Cuadro 5.	Número de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’ previo y posterior a la exposición de inóculo de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> M y su valor porcentual (%), según tratamiento aplicado, etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH 4) y testigo de agua. Corporación Bananera Nacional. 2022.	33

Índice de figuras

Figura 1. Altura promedio (cm) en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, durante cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021-2022.	28
Figura 2. Altura (cm) de explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, a través de cinco subcultivos, ante la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021-2022.	29
Figura 3. Número de brotes promedio en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, durante cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021-2022.....	30
Figura 4. Número de brotes por explante de banano cv. ‘Gran Enano’, a través de cinco subcultivos. Ante la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH 4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021-2022.	31
Figura 5. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad *día), de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’ seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> M. Primer cuartil (A), segundo cuartil (B), tercer cuartil (C) y cuarto cuartil (D). Corporación bananera Nacional. 2022.	34
Figura 6. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad*día), según días después de la inoculación (ddi), de plantas banano cv. ‘Gran Enano’, pertenecientes al primer cuartil (A), de los individuos seleccionados con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> M. Corporación bananera Nacional. 2022.	35
Figura 7. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad*día), según días después de la inoculación (ddi), de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’, pertenecientes al segundo cuartil (B), de los individuos seleccionados con menor	

afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> M. Corporación bananera Nacional. 2022.	36
Figura 8. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad*día), según días después de la inoculación (ddi), de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’, pertenecientes al tercer cuartil (C), de los individuos seleccionados con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> M. Corporación bananera Nacional. 2022.	37
Figura 9. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad*día), según días después de la inoculación (ddi), de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’, pertenecientes al cuarto cuartil (D), de los individuos seleccionados con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> M. Corporación bananera Nacional. 2022.	38
Figura 10. Composición de los grupos de plantas seleccionadas. A) primer cuartil, B) segundo cuartil, C) tercer cuartil y D) cuarto cuartil, según los tratamientos a los que fueron sometidas las plantas de banano cv. ‘Gran Enano’. Etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH 4) y testigo de agua. Corporación Bananera Nacional. 2022.....	39

Índice de anexos

Anexo 1. Grados de la escala de Stover (1980) modificada por Gauhl (1989), para evaluar la severidad de la Sigatoka negra (<i>Pseudocercospora fijiensis</i> M) en banano cv. ‘Gran Enano’. Tomada de Arzate-Vega et al. (2006).	58
Anexo 2. Escala visual de grados de Stover (1980) modificada por Gauhl (1989), para evaluar la severidad de la Sigatoka negra (<i>Pseudocercospora fijiensis</i>) en plántulas de banano (<i>Musa AAA</i>). A) Grado 1, B) Grado 2, C) Grado 3, D) Grado 4, E) Grado 5 y F) Grado 6.	58
Anexo 3. Análisis de varianza para la variable Sobrevivencia (%) en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, al primer subcultivo posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas.	59

Anexo 4. Análisis de varianza para la variable Altura promedio (cm) en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, durante cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas.	59
Anexo 5. Análisis de varianza para la variable Número de brotes promedio en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, durante cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas.....	59
Anexo 6. Coeficiente de correlación en de variables medidas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de Pseudocercospora fijiensis M. Corporación bananera Nacional. 2022.	60
Anexo 7. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE), Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS) evaluadas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de Pseudocercospora fijiensis M (Grupo A). Corporación bananera Nacional. 2022.	60
Anexo 8. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE), Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS) evaluadas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de Pseudocercospora fijiensis M (Grupo B). Corporación bananera Nacional. 2022.....	61
Anexo 9. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE), Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS) evaluadas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de Pseudocercospora fijiensis M (Grupo C). Corporación bananera Nacional. 2022.....	63
Anexo 10. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE), Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS) evaluadas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de Pseudocercospora fijiensis M (Grupo D). Corporación bananera Nacional. 2022.	64

1 Introducción

El banano (*Musa* sp.), es una planta perenne perteneciente a la familia musaceae, que debido a su alto valor nutricional tiene gran demanda alrededor del mundo, por lo que es producido en más de 120 naciones. Además, se considera fundamental para la economía de países en vía de desarrollo, ya que alrededor de un tercio de la producción mundial se genera en América latina y el Caribe (Vargas- Céspedes *et al.*, 2017). En Costa Rica, el banano es el principal producto agrícola de exportación. Además, se encuentra entre los principales países exportadores a nivel mundial, antecedido por Las Filipinas, Ecuador y Guatemala. En el año 2021, en el país se exportaron alrededor de 120 millones de cajas de banano, generando \$1066 millones de divisas (Corporación Bananera Nacional [CORBANA], s.f., Ministerio de Comercio Exterior [COMEX], 2021).

La producción de banano se ve afectada por factores tanto abióticos como bióticos que reducen el rendimiento, siendo los segundos los más limitantes. Los problemas bióticos pueden ser ocasionados por plagas insectiles como picudo negro (*Cosmopolites sordidus*), cochinilla (*Pseudococcus elisae*) y araña roja (*Tetranychus urticae*), a su vez, es afectado por el nematodo barrenador *Radophulus similis* (Simón & Pérez, 2021).

Como parte de estos, destacan las enfermedades que afectan tanto a nivel foliar, como radical. Entre estas se encuentra El Mal de Panamá, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Schldl., el Moko, ocasionado por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi., y la Sigatoka negra, causada por *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (Vargas- Céspedes *et al.*, 2017). Esta última es la enfermedad foliar que más limita la producción bananera en Costa Rica, generando pérdidas de hasta un 80% (Álvarez *et al.*, 2013; Orozco *et al.*, 2013).

El control de la Sigatoka negra se realiza principalmente por medio de aplicaciones aéreas calendarizadas de fungicidas químicos. Esta actividad implica un impacto ambiental de importancia y a su vez representa alrededor de un 27% del costo total de producción (García-Regalado, 2019; Vargas-Céspedes *et al.*, 2017). Además, el patógeno ha mostrado una pérdida de sensibilidad a los ingredientes activos implementados para su control, lo que disminuye la eficiencia de las aplicaciones (García- Regalado, 2019).

Con base a lo anterior, Burbano-Figueroa (2020) y Cedeño- García *et al.* (2017), mencionaron que el uso de variedades mejoradas puede contribuir a la disminución de los costos de producción, a raíz de una mayor adaptabilidad y respuesta genética de la planta frente a factores bióticos y abióticos, propiciando una reducción en el uso de los agroquímicos, lo que genera que sea una opción más sustentable con el ambiente.

El fitomejoramiento del banano se encuentra enfocado en la búsqueda de variabilidad, ya que, por su naturaleza reproductiva, esta se ve limitada debido a que presenta una reproducción asexual obligada (Camayo, 2015). La inducción de variabilidad por medio de mutaciones es ampliamente aplicada para especies de esta naturaleza, ya que busca aumentar la frecuencia de mutaciones espontáneas y potenciar las probabilidades de generar cambios a nivel genético que resulten en eventos beneficiosos (Jain, 2011).

Los métodos para inducir mutaciones más utilizados han sido los agentes físicos, como la irradiación con rayos Gamma y los químicos mediante la aplicación de etil metano sulfonato (EMS) o la azida de sodio (AS). Recientemente, los medios químicos son implementados con mayor frecuencia, debido a su alta efectividad, al actuar aleatoriamente en secciones pequeñas del ADN, generando mutaciones puntuales en el genoma, lo que disminuye la probabilidad de un evento de mutación negativa que sea perjudicial para la planta (Saraswathi *et al.*, 2016).

La mutagénesis inducida por agentes químicos es una alternativa de mejoramiento genético que permite generar variabilidad en especies que por naturaleza no la poseen y mediante la cual se pueden obtener características de interés agronómico. Es por ello, que el presente trabajo pretende conocer la respuesta de plantas de banano tratadas con agentes mutagénicos químicos, ante la exposición de inóculo del hongo patógeno *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la respuesta en condiciones de campo abierto, de plantas M₁V₅ de banano (*Musa AAA*) subgrupo Cavendish, cv. ‘Gran Enano’, generadas a partir del tratamiento con los agentes mutagénicos etil metano sulfonato o azida de sodio, ante la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis*.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar a nivel *in vitro* la frecuencia de plántulas variantes y su correlación con respecto al agente mutagénico aplicado, sea etil metano sulfonato o azida de sodio, a dosis única.
2. Seleccionar en campo plantas M₁V₅ de banano, generadas a partir del tratamiento con etil metano sulfonato o azida de sodio, que presenten la menor afectación ante la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M., en campo abierto.

3 Revisión de literatura

3.1 Aspectos generales del cultivo de banano (*Musa AAA*)

El banano es originario del sureste de Asia. Sin embargo, es cultivado ampliamente en zonas de clima tropical y subtropical. La mayoría de las musáceas son plantas agámicas obligadas y su biología reproductiva está determinada por flores femeninas estériles, lo que genera que se produzcan frutos partenocarpicos (Camayo, 2015).

Este, pertenece al orden de las Zingiberales, familia Musaceae, género *Musa sp.* y sección *Eumusa*. Esta sección abarca a las especies silvestres *Musa acuminata* Colla (AA) y *Musa balbsiana* Colla (BB), de quienes, a través de siglos de domesticación e hibridación natural, dieron origen a la gran cantidad de cultivares de plátanos y bananos existentes en la actualidad y que además poseen múltiples combinaciones de ploidía (Sandoval y Müller, 1999; Arteaga, 2015).

Entre la gran diversidad de bananos comestibles, se destacan los pertenecientes al grupo triploide *AAA*, dentro del cual se encuentran los subgrupos ‘Gros Michel’ y ‘Cavendish’. Este último predomina en el mercado para exportación, ya que se cultiva en todos los países dedicados a la producción bananera, por lo que ha desplazado del mercado internacional la producción de otras variedades, gracias a sus atributos en cuanto a rendimiento y resistencia a enfermedades (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO], 2016). El cultivar ‘Gran Enano’ perteneciente al subgrupo Cavendish, es el más utilizado en Costa Rica y demás países productores (Vargas-Céspedes *et al.*, 2017). Debido a características morfológicas, que les otorga tolerancia a factores abióticos como volcamientos, exceso de humedad y sequía. Además, la planta al presentar un porte bajo permite sistemas de producción a una alta densidad y es preferido por su resistencia a la raza 1 de la enfermedad del Mal de Panamá. Sin embargo, este es susceptible a problemas bióticos ocasionados por el nemátodo barrenador y la Sigatoka negra (Benavides-Silva, 2018; Calderón, 2019).

3.2 Ploidía de banano (*Musa AAA*) cv. ‘Gran Enano’

La composición del genoma de los diversos cultivares de banano están originados por el nivel de ploidía. Así, los ejemplares pertenecientes a la sección *Eumusa* pueden ser diploides ($2n=22$), triploides ($3n=33$) o tetraploides ($4n=44$) (Novak 1992).

El cultivar ‘Gran Enano’ es una planta triploide con un genoma *AAA*, por lo que sus características están otorgadas por la especie silvestre *M. acuminata* (Valarezo-Pacheco, 2015). Este tipo de ploidía genera una alta esterilidad femenina, ocasionada por irregularidades en la recombinación durante el proceso de meiosis, lo cual limita el desarrollo de gametos funcionales propios de una reproducción sexual, generando que los frutos producidos sean partenocárpicos, además, conduce a una reproducción asexual obligada en la especie (Camayo, 2015).

3.3 Principales enfermedades que afectan al cultivo

El banano al ser cultivado mayormente en zonas de clima tropical se encuentra propenso al ataque de diversas enfermedades (Vargas- Céspedes *et al.*, 2017).

Entre estas destacan el Mal de Panamá, causada por el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, la cual es de suma importancia a nivel mundial debido a su agresividad sobre las musáceas y a su gran potencial evolutivo (Soto, 2015; Boschini, 2018). La raza 1 de este patógeno desplazó el cultivar de banano ‘Gros Michel’ debido a la susceptibilidad ante el hongo, obligando a implementar el uso de otros cultivares resistentes, dentro de los cuales destacan los Cavendish (López & Castaño, 2019).

Ambos cultivares: Gros Michel y Cavendish, son susceptibles a la raza tropical 4, la cual es un peligro inminente para los países productores. Esta raza se encuentra presente en 20 de 135 países productores, situados en el sureste asiático, Oceanía, África y en el año 2019 se reportó en Colombia, no obstante, gracias a la activación de planes de contingencia y medidas de prevención se ha logrado evitar la diseminación de la enfermedad a demás países productores (Martínez *et al.*, 2020).

El Moko, causada por *Ralstonia solanacearum*, es la enfermedad bacteriana que más afecta al cultivo alrededor del mundo, debido a que posee un amplio rango de hospederos (Álvarez *et al.*, 2013; Soto, 2015). De esta bacteria, la raza que es patogénica en banano, plátano y Heliconia, es la raza 2, que es endémica de América Central y Sur, por lo que se encuentra ampliamente distribuida por el continente americano (Álvarez *et al.*, 2013).

Si bien, el manejo para esta enfermedad es limitado, con adecuadas medidas preventivas como uso de semilla libre del patógeno, erradicación de plantas enfermas y adecuada

desinfección de herramientas agrícolas, se logra mitigar la afectación de la bacteria en la producción (Ramírez *et al.*, 2020).

Finalmente, La Sigatoka negra, causada por el hongo ascomycete *Pseudocercospora fijiensis*, es considerada la enfermedad foliar de mayor impacto en la producción de banano, ya que en la actualidad se encuentra distribuida a lo largo de los países de clima tropical (Gúzman, 2013, citado en Alfaro, 2019). Esta enfermedad puede generar pérdidas de hasta un 80%, a causa de una disminución en el área fotosintética, lo cual afecta al desarrollo del cultivo, reflejándose en parámetros que limitan el rendimiento como racimos pequeños, frutos de bajo calibre e incluso maduración precoz (Álvarez *et al.*, 2013; Orozco *et al.*, 2013)

Además, en la actualidad, no se ha registrado un cultivar de banano de carácter comercial que sea resistente a la enfermedad (Cuéllar *et al.*, 2011).

3.4 Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis* M.)

El patógeno causante de la Sigatoka negra se identificó por primera vez en las islas de Fiji, en el continente de Oceanía; posteriormente se dispersó a los demás países productores, llegando a Centroamérica en el año 1972 y finalmente a Costa Rica en el 1979 (Soto, 2015). Entre los factores que favorecieron el establecimiento de la Sigatoka en los países tropicales, fue su fácil dispersión y rápido ciclo reproductivo, favorecido por condiciones de humedad relativa de 90% a 100%, temperaturas entre 25 a 30 °C y precipitaciones constantes (Larrea, 2020).

El ciclo de la enfermedad consta de dos fases, la asexual, donde los conidióforos generados a partir de los primeros estadios de las lesiones contienen conidios, que son dispersados principalmente mediante lluvia, salpique y escurrimiento. Por otro lado, en el estado sexual del hongo, se producen pseudotecios que contienen ascas con ascosporas en su interior, las cuales son el principal medio de dispersión a largas distancias, ya que estas pueden viajar por viento, logrando un radio de dispersión de hasta 50 km (Guzmán, 2002, citado por Alfaro).

La infección inicia a partir de la penetración de los tubos germinativos de la espóra a través de los estomas, en condiciones favorables el ciclo puede tener una duración de 20 a 50 días (Guzmán, 2002, citado por Alfaro, 2019; Larrea, 2020).

Los síntomas y signos de la enfermedad tienden a ser muy característicos y se manifiestan en seis estadios. Al inicio está la etapa de pizca (estadio 1), donde aparecen pequeñas manchas pálidas en el envés de la hoja, seguido por las etapas de estría, donde las pizcas se alargan y toman un color marrón claro (estadio 2), después estas se tornan marrón oscuro y son perceptibles en el haz de la hoja como una estría clorótica (estadio 3). En la fase de mancha, las estrías se ensanchan y se tornan marrón en ambos lados de la hoja (estadio 4), luego alrededor de estas, se forma un halo clorótico con el centro de la lesión de apariencia seca, hundida y de color negro (estadio 5). Por último, en el estadio 6, las manchas se tornan color grisáceo, con un halo negro y uno clorótico bien definido (Benavides-López, 2019; Moposita, 2018).

3.5 Combate y monitoreo de Sigatoka negra

Desde que la Sigatoka negra se estableció en las plantaciones bananeras, el manejo se ha llevado a cabo mediante el conjunto de prácticas integradas, donde el principal objetivo es la mitigación de las secuelas que la enfermedad pueda ocasionar en el cultivo, así como reducir el avance de esta en la plantación. Para esto, se realizan prácticas como deshoja en plantas afectadas, con el fin de disminuir la fuente de inóculo; a esto se suma una adecuada densidad de siembra en el establecimiento, manejo de plagas, malezas y una óptima nutrición, a fin de propiciar vigor en las plantas y una menor susceptibilidad ante futuras infecciones (Orozco *et al.*, 2013).

Sin embargo, en conjunto con las prácticas anteriores, se utiliza el control químico, que en la actualidad es el más implementado para el manejo de Sigatoka negra. En Costa Rica, este se lleva a cabo mediante aplicaciones aéreas de fungicidas protectores de contacto, con acción multisitio, alternados con sistémicos de los grupos triazoles, estrobirulinas y benzimidazoles; sin embargo, en los últimos años, se ha detectado resistencia por parte de *P. fijiensis* a los tres grupos de fungicidas sistémicos mencionados (Benavides-López, 2019). Las aplicaciones tienden a ser calendarizadas, lo que ocasiona que el control de esta enfermedad abarque aproximadamente un 27% de los costos de producción (Marín *et al.*, 2003; Soto, 2015).

En plantaciones comerciales, la calendarización de las aplicaciones de fungicidas va sujeta a un adecuado sistema de monitoreo, el cual al realizarse semanalmente otorga información sobre la incidencia y grado de afectación de la enfermedad en la plantación y facilita la toma de decisiones en cuanto al momento adecuado para realizar la aplicación química (Moposita, 2018).

El principal sistema empleado es la escala de severidad de Stover (1980) modificada por Gauhl (1989). Este es un método no destructivo que se basa en la estimación del desarrollo de la enfermedad, a partir de una escala, que asigna valores que van del grado del cero al seis, según la estimación visual del porcentaje de área foliar afectada y número de lesiones (Anexo 1). Este método permite crear un promedio ponderado de infección y un estimado de hojas funcionales en el cultivo, a partir de la evaluación en todas las hojas de las plantas a evaluar. Para evaluación, se toma como hoja 1, el primer folio completamente expandido después de la hoja candela y el sistema aporta además, la hoja más joven que presente síntoma de Sigatoka negra (HMJS) (Orozco *et al.*, 2013).

Existen herramientas estadísticas que facilitan la interpretación de los datos obtenidos, como por ejemplo la que genera el área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (Galindo, 1993).

Este es un método que permite la integración del avance de la infección en el tiempo y el efecto acumulativo de este sobre la plantación. Cuéllar *et al.* (2011) realizaron la evaluación de diferentes genotipos de musáceas ante la inoculación con diferentes aislamientos de *P. fijiensis*, mediante las siguientes variables: periodo de incubación, tiempo de evolución de los síntomas (TES), área bajo la curva del desarrollo de la enfermedad (ABCDE) y tasa de desarrollo (r) del progreso de la enfermedad. Al analizar los resultados, se obtuvo que (ABCDE) y (r) fueron las que mejor explicaron la interacción entre el genotipo y el aislamiento del hongo.

3.6 Mejoramiento genético en banano

La biología reproductiva de una especie incide en la generación de variabilidad dentro de esta (Nakayama *et al.*, 2018). El banano, al presentar reproducción asexual obligada, presenta poca variabilidad, por lo que, en su mejoramiento genético hay que recurrir a técnicas

complementarias que faciliten la obtención de caracteres de interés agronómico, como resistencia o tolerancia a factores bióticos y abióticos o bien, características que favorezcan la productividad del cultivo (Abdulhafiz *et al.*, 2018). Según Camayo (2015) y Jain (2010), en el mejoramiento del banano, las metodologías usadas con mayor frecuencia incluyen técnicas de cruzamientos y biotecnológicas.

Un programa de mejoramiento genético en banano por medio de cruzamientos se basa en el cruce entre organismos con diferente nivel de ploidía, para introducir las características deseadas, esto genera, en la mayoría de los casos, organismos triploides mejorados. La Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA) ha logrado desarrollar diversos híbridos por este método, cruzando inicialmente organismos con tetraploidía inducida (4x) con diploides (2x) que posean la característica que se desea introducir, para generar híbridos triploides mejorados (3x) (Amorin *et al.* 2016, citado por Torres & Sandoval, 2020).

Sin embargo, este proceso es complejo por la naturaleza genotípica de la especie y tiende a durar muchos años hasta que el individuo mejorado presente una constitución genética estable, por lo que, se han implementado métodos alternos que incluyen la aplicación de agentes mutagénicos para generar variabilidad, esto en gran medida apoyado de técnicas biotecnológicas de micropropagación (Heslop- Harrison & Schwarzacher, 2007; Muharram *et al.*, 2020).

3.7 Micropropagación *in vitro* como herramienta en programas de mejoramiento genético.

Las técnicas biotecnológicas en un marco de mejoramiento genético han sido orientadas a la propagación *in vitro* de tejidos a partir de diferentes órganos de la planta. Esto favorece la multiplicación vegetativa a gran escala en poco tiempo, lo que es de suma utilidad en programas de fitomejoramiento donde se requieren poblaciones de gran tamaño (Leiva-Mora, 2006).

Con la ayuda de estas tecnologías, se ha facilitado la implementación de la mutagénesis vegetal artificial en programas de mejoramiento en banano (Abdulhafiz *et al.*, 2018), ya que según Jain (2010), para este fin es necesario contar con una población de gran tamaño, para así aumentar las probabilidades de observar el evento de mutación deseado.

Además, la propagación *in vitro* facilita el proceso de estabilidad genética del material tratado por agentes mutagénicos, ya que, tras producirse la primera generación mutante (M_1), se promueve la heterogeneidad genotípica, a raíz de un alto grado de quimerismo (Nakayama *et al.*, 2018). Este fenómeno se puede disminuir realizando varios ciclos de regeneración, también denominados subcultivos (V_n), ya que a través de estos se incita la disociación de quimeras. Jankowicz-Cieslak *et al.* (2012) mencionan, que con al menos cuatro subcultivos de la primera generación mutante (M_1V_4) se logra reducir un posible evento de quimerismo y se obtiene un material con alto grado de homogeneidad genética.

Por otro lado, la propagación *in vitro*, con respecto al mejoramiento genético se basa en que, a partir de diversos ciclos de regeneración, aumentan las probabilidades de que se generen variaciones somaclonales, las cuales estas pueden generar cambios a nivel genético o epigenético que pueden conservarse e inclusive ser heredables. Sin embargo, estas variaciones pueden ser contraproducentes cuando el objetivo es la conservación de un material. Por esto, para prevenir la aparición de estos eventos se ha recomendado no prolongar a más de cinco subcultivos un material, regular la presencia de fitohormonas que puedan promover la sobre producción de brotes y mantener un balance adecuado de nutrientes y suplementos adicionados al medio de cultivo (Jankowicz- Ciésłak & Ingelbrecht, 2022).

3.8 Mutagénesis

La mutagénesis es un proceso en el cual se da una variación en la constitución genética de un organismo a causa de mutaciones. Estas pueden ser generadas de manera natural, sin embargo, se expresan a muy baja frecuencia, ya que existen diversos mecanismos que reparan los cambios en la cadena de ADN. Debido a esto, se tiende a emplear métodos artificiales por medio de agentes mutagénicos, que aumentan la frecuencia de las mutaciones y consigo la probabilidad que estas produzcan un cambio a nivel proteico y se expresen (Saraswathi *et al.*, 2016).

Entre los principales métodos para inducir mutaciones se encuentran, los medios físicos a través de irradiaciones; sin embargo, a dosis elevadas estos tienden a ocasionar mutaciones a gran escala, aumentando las probabilidades de eventos no favorables (Hernández-Muñoz, 2019). En el caso de los medios químicos, estos se realizan por medio de la aplicación de

sustancias que generan una alta tasa de variaciones puntuales en el ADN, lo que disminuye la probabilidad de mutaciones múltiples, que pueden dar lugar a características no deseadas (Díaz, 2015). Esta alternativa es ampliamente usada, debido a su bajo costo en comparación con los métodos físicos y a su vez presenta una alta eficiencia (Vargas-Segura, 2016).

Entre las sustancias químicas más utilizadas se encuentra el etil metano sulfonato (EMS), el cual es un agente alquilante, que genera modificaciones en la conformación de las bases nitrogenadas del ADN por medio de la adición de grupos alquilo. Esto ocurre generalmente en la guanina y provoca que las enzimas involucradas en la replicación no reconozcan la estructura, esto causa que se adicione una timina como base complementaria, lo que resulta en una transición GC > AT, conduciendo a un cambio en la información genética del organismo (Lee *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2016).

Otro agente que se utiliza con frecuencia es la azida de sodio (AS). Este compuesto no alquilante, actúa por medio de una interacción directa con el ADN almacenado en el núcleo de las células, lo que se facilita en un medio ácido (pH 3-4). Esto genera mutaciones puntuales en el genoma, que pueden propiciar una modificación en la estructura de los aminoácidos, lo que conduce a una alteración en las funciones metabólicas que van a producir variaciones (Benito, 2019; Xu *et al.*, 2011).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) (2021), gracias a la mutagénesis química, se ha logrado mejorar más de 300 variedades de diversos cultivos, entre los cuales destacan la cebada, el arroz, el maíz y el trigo. Para el cultivo de banano, dada su naturaleza agámica obligada y de la baja tasa de mutaciones espontáneas, Jain (2010) indica que la mutagénesis inducida es una herramienta que posee el potencial para generar variabilidad en este cultivo.

En este sentido, la literatura presenta diversos ensayos en los que se han empleado estos dos agentes mutagénicos en banano. Boschini (2018) trató meristemas apicales de banano cv. Gros Michel (Grupo AAA) a diferentes dosis de EMS, con el fin de obtener plantas resistentes a la Fusariosis del banano raza 1 y determinó que la dosis de 172mM por 6 horas generó una mayor tasa de mutaciones.

Otra investigación que buscaba tolerancia hacia esta misma enfermedad, trató con EMS y AS meristemas apicales de banano cv. Highgate (Grupo AAA). A partir de esto, se obtuvo que, entre un 2% y 6% de las plantas regeneradas, presentaron menos de un 10% de daño vascular por parte de la enfermedad. Además, se determinó la dosis óptima para estos agentes mutagénicos que es de 0,2 M por 30 min y 0,0023 M por 30 min para el EMS y AS respectivamente (Bhagwat & Duncan 1998).

Con la aplicación de EMS y AS, para mejorar el cultivar de banano Rasthali (Grupo AAB), frente al ataque del Mal de Panamá y a su vez determinar la dosis letal media (DL_{50}) para explantes obtenidos de meristemas apicales y brotes proliferantes, Saraswathi *et al.* (2016) obtuvieron que, para los primeros, la dosis óptima fue de 0,2 M por 3 horas para EMS y de 0,0058 M por 5 horas para la AS, en cuanto a los brotes proliferantes las dosis recomendadas fueron de 0,6 M por 30 min EMS y 0,0028 por 2 horas AS.

4 Metodología

4.1 Localización

La etapa experimental se dividió en dos fases. El cultivo *in vitro* del material. Se realizó en los laboratorios de Mejoramiento de los Cultivos y de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), situados en la Universidad de Costa Rica, sede Rodrigo Facio en San Pedro de Montes de Oca.

La segunda fase, en condiciones de campo, se llevó a cabo en las instalaciones de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), ubicada en La Rita de Pococí, Limón a una altura de 111 msnm. El distrito de La Rita cuenta con una precipitación anual promedio de 4000 - 5000 mm, temperatura de 27 °C y humedad relativa superior al 80% (Guzmán-Álvarez & Guzmán, 2014).

4.2 Material experimental

En la fase *in vitro* se definió como unidad experimental un frasco que contenía tres explantes de banano (*Musa AAA*), subgrupo Cavendish, variedad ‘Gran Enano’, proporcionados por la Corporación Bananera Nacional (CORBANA). En campo, se tomó como unidad la planta individual de banano.

4.3 Procedimiento general

4.3.1 Aplicación del agente mutagénico y subcultivo *in vitro* de las plantas hasta M₁V₅.

La preparación de las soluciones mutagénicas se realizó dentro de una cámara de extracción de gases de bioseguridad en condiciones asépticas, donde se tomó de la solución madre del agente mutagénico y se diluyó en buffer dihidrógenofosfato de sodio 0,1 M pH 4 para la azida de sodio (AS) y pH 7 para el etil metano sulfonato (EMS), para obtener una concentración de 0,003 M y 0,15 M, respectivamente.

Una vez preparada la solución, cada una de estas se pasó a través de un filtro miliporo de 0,2 mesh estéril con la ayuda de una bomba al vacío para obtener una solución aséptica, que se depositó en un erlenmeyer de 500 ml previamente autoclavado.

Posteriormente, en condiciones asépticas, se procedió a exponer los explantes de banano, previamente establecidos *in vitro*, al respectivo tratamiento. Luego, los Erlenmeyer que contenían los explantes y los tratamientos, se taparon y se colocaron en agitación a 110 rpm. En esta condición permanecieron durante 1 hora los explantes inmersos en AS y en buffer pH 4 y por 6 horas los inmersos en EMS, buffer pH 7, además del tratamiento testigo.

La concentración y tiempo de exposición para cada agente mutagénico se estableció a partir de ensayos realizados por Boschini (2018) para la solución de EMS y para la de AS por Saraswathi (2016).

Tras la aplicación de los tratamientos, dentro de una cámara de bioseguridad, se decantó la solución de cada tratamiento en un envase para su respectiva neutralización y desecho. Luego se realizaron tres enjuagues al material vegetal con agua destilada estéril, previo a su traspaso definitivo a frascos de 150 ml con 25 ml de medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) previamente autoclavado y adicionado con inositol (100 mg/l), hierro (36,7 mg/l), ácido nicotínico (0,5 mg/l), tiamina (0,1 mg/l), piridoxina (0,5 mg/l), glicina (2 mg/l), sacarosa (30 g/l), 3mg/ml de 6-bencilaminopurina (BAP) y con un pH ajustado a 5,8 y 2 g/l de Phytigel como gelificante.

Una vez cultivado, los explantes se colocaron en condiciones de oscuridad durante un periodo de 48 horas, con el fin de disminuir el riesgo de oxidación tras la aplicación de los tratamientos. Luego de este periodo, se colocaron en el cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas. Tanto este como el cuarto oscuro, se encontraban a una temperatura de 27 ± 2 °C y una humedad relativa de 70 %. Se realizaron cinco subcultivos, donde cada uno de estos se efectuó a una frecuencia de 21 días. Al final de cada subcultivo se ejecutaron las evaluaciones pertinentes para esta fase del ensayo.

4.3.2 Aclimatación de materiales de banano (*Musa AAA*).

Una vez transcurrida la generación de los subcultivos, para el establecimiento de las vitroplantas a condiciones de invernadero, el material se trasladó a las instalaciones de

CORBANA en La Rita de Pococí, Limón, con el cuidado necesario para no perder la trazabilidad de los tratamientos. Para la aclimatación se siguieron las recomendaciones propuestas por Alvarado-Capó *et al.* (2002) y Galán *et al.* (2018). Los frascos de cultivo se extrajeron del cuarto de crecimiento cuando los explantes presentaban en promedio una altura de 5 cm, sistema radical desarrollado y al menos dos hojas expandidas.

Una vez extraídos los explantes de los frascos, se eliminó el residuo del medio de cultivo y se trasplantaron a bandejas de almácigo # 72 con peat moss como sustrato. Las plántulas se colocaron en condiciones de invernadero, donde permanecieron durante ocho semanas con sistema de riego por nebulización periódica para mantener la humedad.

Transcurrido este periodo, las plántulas se trasplantaron a bolsas de almácigo donde se desarrollaron por ocho semanas.

Durante la aclimatación se realizó fertilización foliar dos veces a la semana con Tecamin® y Bayfolan®, siguiendo el protocolo de plantas de vivero de la Corporación Bananera Nacional. Posteriormente, las bolsas de almácigo se trasladaron a la parcela de evaluación para proceder con las siguientes etapas del ensayo.

4.3.3 Determinación de la respuesta de plantas M₁V₅ ante la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis*.

Una vez aclimatadas las plantas M₁V₅, se transportaron a invernadero, para continuar con el desarrollo de estas, previo a la exposición a inóculo.

Tras cumplir las dieciséis semanas de desarrollo, las plantas se trasladaron en sus bolsas de almácigo a la parcela de evaluación, la cual contaba con un techo de malla de sarán negro al 60%. Se procedió a marcar la primera hoja completamente expandida, previo a la exposición al inóculo. La cual se efectuó por medio del traslado de las plantas a la parcela control de Sigatoka (lote “El Chineado”) de la Corporación Bananera Nacional. Se mantuvieron expuestas al inóculo natural durante un periodo de cinco días.

Transcurrido el periodo de exposición, el material se trasladó de nuevo a la parcela de evaluación y mantuvo en este durante siete semanas, donde se llevaron a cabo las evaluaciones propuestas en las hojas marcadas previo a la inoculación. Esta etapa se realizó en las instalaciones de CORBANA en La Rita de Pococí, Limón.

La exposición a inóculo de Sigatoka negra se realizó en base al criterio del Eje de Fitoprotección de la Corporación Bananera Nacional, ya que para fines de ensayos de campo, es más eficiente realizar una exposición natural al inóculo del hongo debido a factores climáticos de la zona que facilitan el establecimiento de la enfermedad en las plantas (M. Guzmán, comunicación personal, 09 de agosto de 2021)

4.4 Diseño experimental

4.4.1 Determinación a nivel *in vitro* de plántulas variantes y su correlación respecto al agente mutagénico aplicado.

Para responder al primer objetivo específico, se realizó un diseño de bloques completos al azar. Se realizaron seis bloques (repeticiones), cada uno se conformó por una bandeja con 30 frascos, abarcando los cinco tratamientos distribuidos al azar y cada uno de estos estuvo representado por seis frascos (observaciones). La población inicial del ensayo fue de 540 explantes.

Los tratamientos consistieron en la aplicación de las soluciones de un agente mutagénico a dosis única, los buffers utilizados para su preparación y a manera de testigo agua destilada. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados a explantes de banano cv. ‘Gran Enano’. Laboratorio del Centro de Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica.2021.

Código de tratamiento	Descripción	Dosis (M/h)
EMS	Etil metano sulfonato.	0,15 M/6 h
B. pH7	Buffer dihidrógeno fosfato de sodio pH 7.	0,1 M/6 h
AS	Azida de sodio.	0,003 M/1 h
B. pH4	Buffer dihidrógeno fosfato de sodio pH 4.	0,1 M/1 h
Testigo	Agua destilada.	6 h

Las variables que se evaluaron en esta etapa fueron:

- 1) Porcentaje de sobrevivencia (%). Entendido como la cantidad de explantes sobrevivientes sobre el total,

- 2) Altura (cm). Longitud tomada a partir de la base del cormo, hasta la punta extrema de la hoja candela.
- 3) Número de brotes por explante. Entendido como aquellos brotes laterales, provenientes de la plántula principal.
- 4) Plántulas variantes (%). Aquellas que presentan una variación en cuanto a su coloración y/o morfología respecto al testigo.

Las evaluaciones de dichas variables se realizaron en toda la población que compone a cada uno de los bloques, previo a generar un nuevo subcultivo.

4.4.2 Evaluación de la respuesta de plantas M₁V₅ ante la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis*.

Para la evaluación de la respuesta de las plantas M₁V₅, debido a la naturaleza descriptiva del experimento, se efectuó un censo en la totalidad de la población que se ubicó aleatorizada en el lote experimental asignado por CORBANA.

Las variables evaluadas fueron:

- 1) Incidencia de plantas enfermas. Entendido como el número de plantas con síntomas de Sigatoka negra en la hoja evaluada.
- 2) Grado de severidad, hace referencia al porcentaje de tejido foliar afectado por la enfermedad en estudio en la hoja evaluada. Para esto, se empleó la escala de severidad de Stover (1980) modificada por Gauhl (1989) (Anexo 1 y 2).
- 3) Número de hojas, considera la cantidad total de hojas vivas presentes, tomando en cuenta el estado de desarrollo de la hoja candela.
- 4) Hoja más joven con síntomas (HMJS). Esta variable se refiere a la primera hoja totalmente abierta, contada de arriba hacia abajo, que presentara lesiones ocasionadas por Sigatoka negra.

Para la medición de estas variables, se tomó la hoja más joven completamente expandida, marcadas previo a la exposición al inóculo de la enfermedad. Esta misma se evaluó a los 25, 38 y 52 días después de la exposición al inóculo (ddi).

Con el objetivo de seleccionar plantas con menor severidad de Sigatoka negra, se definieron diferentes variables y parámetros durante cada una de las evaluaciones, a partir de prácticas realizadas a nivel de vivero (R. Villalobos & F. Alfaro, comunicación personal, 02 de septiembre de 2022) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Variables y descripción de parámetros para considerar plantas de banano cv. ‘Gran Enano’ susceptibles a Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis* M.), según los días después de exposición a inóculo (ddi). Corporación Bananera Nacional, La Rita, Pococí, 2022.

ddi	Variables	Parámetro de descarte
25	Incidencia de plantas enfermas.	Plantas que presentan un 50% del follaje afectado por la enfermedad.
	Grado de severidad.	
38	Incidencia de plantas enfermas.	Grado 5 de severidad en las hojas de evaluación.
	Grado de severidad.	
52	Incidencia de plantas enfermas.	Grado 5 de severidad en las hojas de evaluación.
	Grado de severidad.	
	Número de hojas. Hoja más joven con síntoma.	

4.5 Análisis de datos

Para caracteres morfológicos comprendidos dentro de la variable porcentaje de plántulas variantes, como Altura y Número de brotes por explante, se realizó un modelo lineal, posteriormente se llevaron a cabo las pruebas de Levene y Shapiro- Wilks, para probar los supuestos de homocedasticidad y normalidad, respectivamente. El mismo procedimiento se realizó para la variable Sobrevivencia. Posteriormente se ejecutó un análisis de varianza (ANDEVA) para el modelo planteado (Anexos 3, 4 y 5). Para la variable categórica de plántulas con variantes, se empleó un cuadro descriptivo. Para el análisis de datos se utilizó el lenguaje R (R Core Team, 2020) y el software Rstudio (R version 4.0.5 (2021-03-31)).

Por otro lado, el de Grado de severidad de Sigatoka negra, se representó por medio de área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) de cada una de las plantas seleccionadas, con el fin de mostrar tendencias en el comportamiento de la población seleccionada a lo largo del periodo de evaluaciones. Además de agrupó de menor a mayor la afectación de Sigatoka negra dentro de las plantas seleccionadas, se calcularon cuartiles, a partir de los valores obtenidos del área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE).

Se realizaron regresiones lineales entre las variables Grado de severidad, Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS), con el fin de establecer si hay correlación entre las variables.

Asimismo, debido a la naturaleza descriptiva de la investigación, se tabularon los datos de las variables: ABCDE, Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS), a manera de detallar el comportamiento de la enfermedad en cada una de las plantas. El primer cuartil “grupo A” (Anexo 7), segundo cuartil “grupo B” (Anexo 8), tercer cuartil “grupo C” (Anexo 9) y cuarto cuartil “grupo D” (Anexo 10).

5 Resultados

5.1 Determinación a nivel *in vitro* de plántulas variantes y su correlación con respecto al agente mutagénico aplicado

En cuanto a la variable Sobrevivencia, a continuación, se presentan los resultados obtenidos en el primero de los subcultivos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de sobrevivencia (%) en explantes de cv. ‘Gran Enano’ *in vitro*, al primer subcultivo posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y el tratamiento testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)
EMS	24,1 c
B. pH7	98,2 a
AS	82,4 b
B. pH4	100,0 a
Testigo	100,0 a

** Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con prueba Tukey.

Como se puede observar, los controles buffer y el testigo obtuvieron una mayor sobrevivencia en los explantes, B. pH7 (98,2%), el B. pH 4 (100%) y testigo (100%), a diferencia de las plántulas expuestas a los agentes mutagénicos, que presentaron diferencia estadística en cuanto a una menor sobrevivencia, AS (82,4%) y EMS (24%).

En la figura 1, se muestran los resultados del promedio de la altura de los explantes durante los cinco subcultivos.

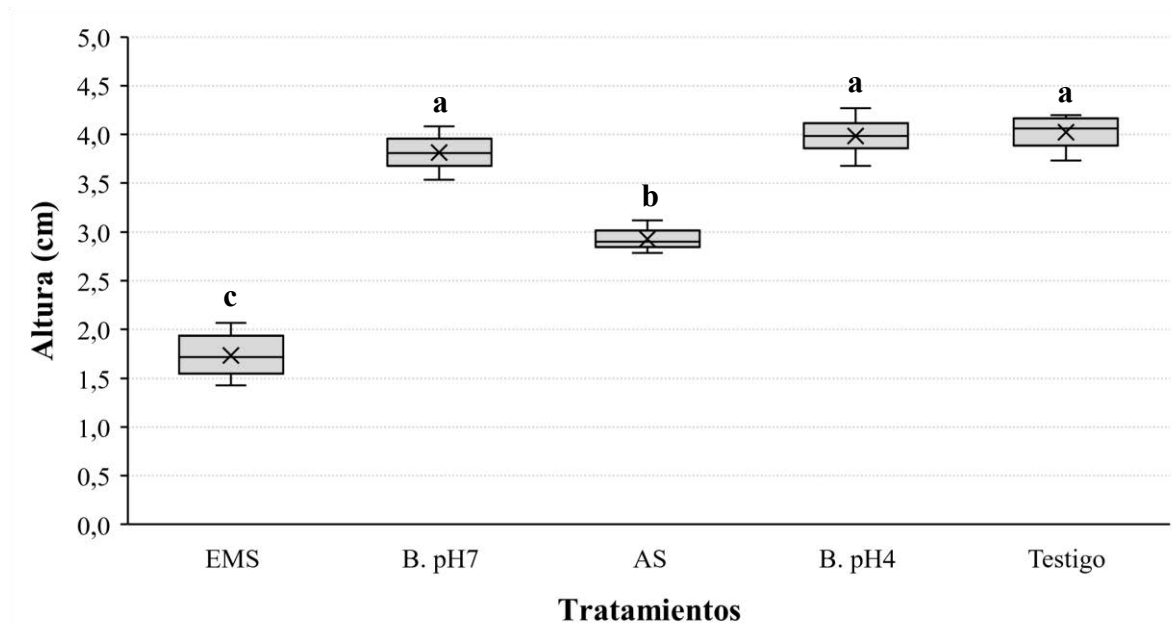


Figura 1. Altura promedio (cm) en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, durante cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021-2022.

** Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con prueba de Tukey.

Se observó que los controles buffer y el testigo, presentaron mayor altura, siendo de 3,8 cm en B. pH7, 3,9 cm en B. pH 4 y 4,0 cm el testigo. A diferencia de estos tratamientos, los explantes tratados con los tratamientos mutagénicos, presentaron una altura significativamente menor, con valores de 2,9 cm para las plantas tratadas con AS y 1,7 cm para las que recibieron el EMS.

En la figura 2, se muestran los resultados de la variable altura, a lo largo de los diferentes subcultivos, para cada uno de los tratamientos evaluados.

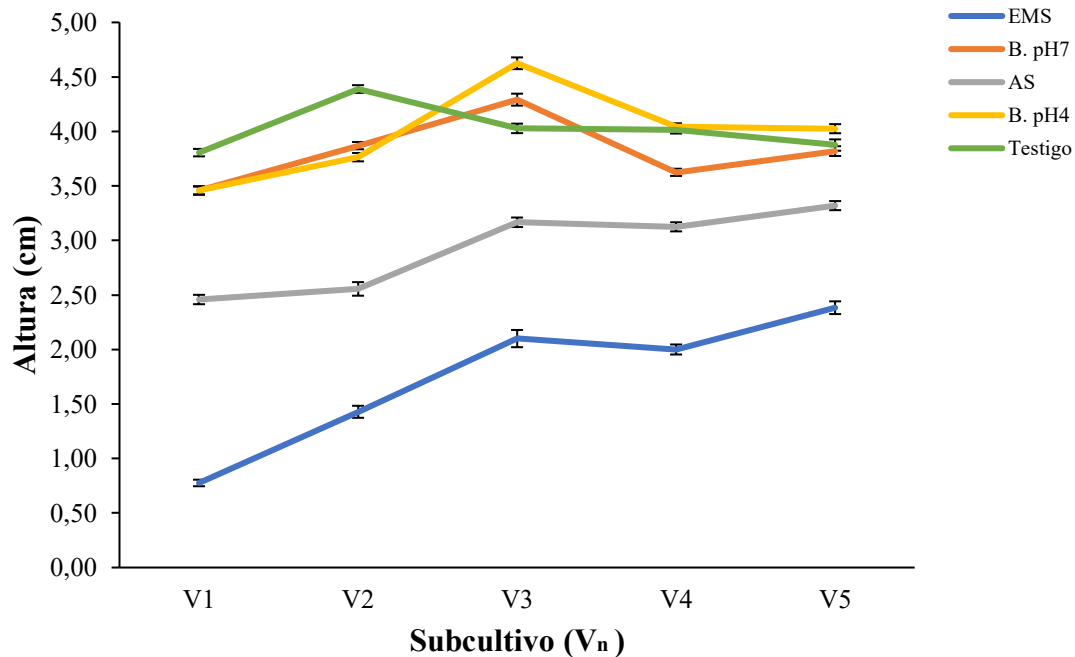


Figura 2. Altura (cm) de explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, a través de cinco subcultivos, ante la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021-2022.

Los explantes de los controles buffer y el testigo mostraron mayor altura a lo largo de los cinco subcultivos, en comparación a los tratados con las soluciones mutagénicas. Además, se observó que, en los tratamientos (con excepción del testigo), se presentó la tendencia de que el mayor incremento para esta variable se dio en el primero, segundo y tercero subcultivo (V1, V2 y V3), y a partir de este último, esta mostró una mayor estabilidad en la altura entre V4 y V5.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos con respecto a la variable número de brotes promedio, para todos los tratamientos como un promedio de los cinco subcultivos.

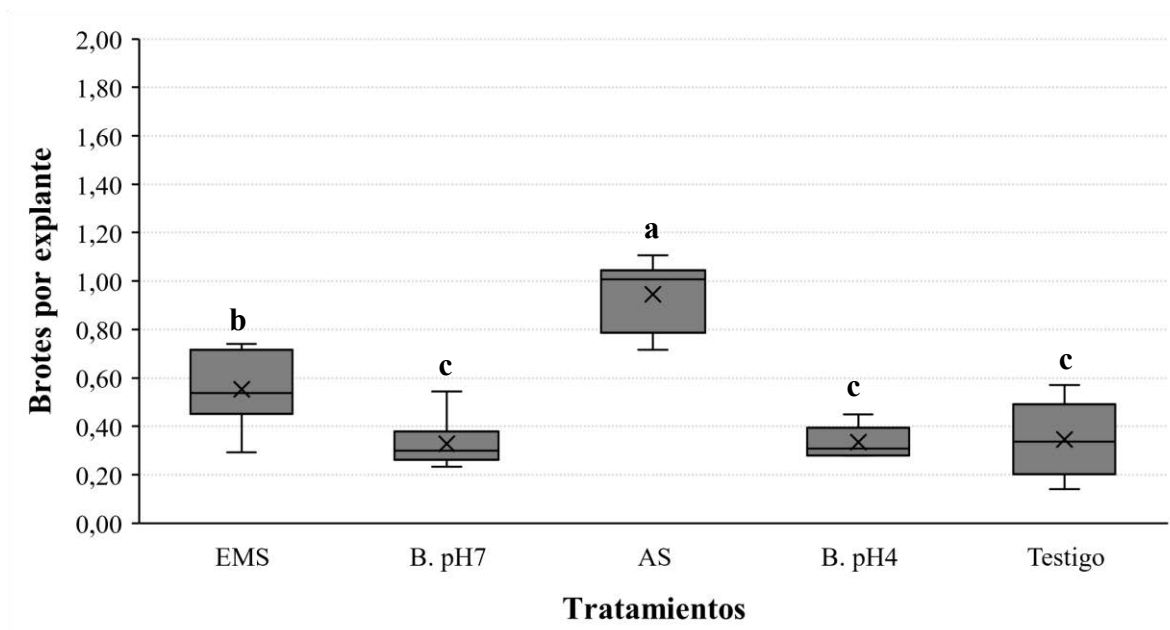


Figura 3. Número de brotes promedio en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, durante cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021-2022.

** Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con prueba de Tukey.

Los tratamientos mutagénicos produjeron un mayor número significativo de brotes por explante, AS (0,94) y EMS (0,60), si se comparan con los controles buffer B. pH7 (0,33), B. pH4 (0,33) y el testigo (0,34).

Cuando la variable se analiza por tratamiento y por subcultivo (Figura 4), se puede observar que, a partir del segundo subcultivo, los explantes tratados con agentes mutagénicos presentaron un mayor número de brotes en comparación con los controles y el testigo. En el tercer subcultivo (V3) el EMS y la AS presentaron el mayor número promedio de brotes por explante con $1,00 \pm 0,04$ y $1,58 \pm 0,07$, respectivamente. Además, a partir de este tercer subcultivo, la producción de brotes disminuyó, para todos los tratamientos.

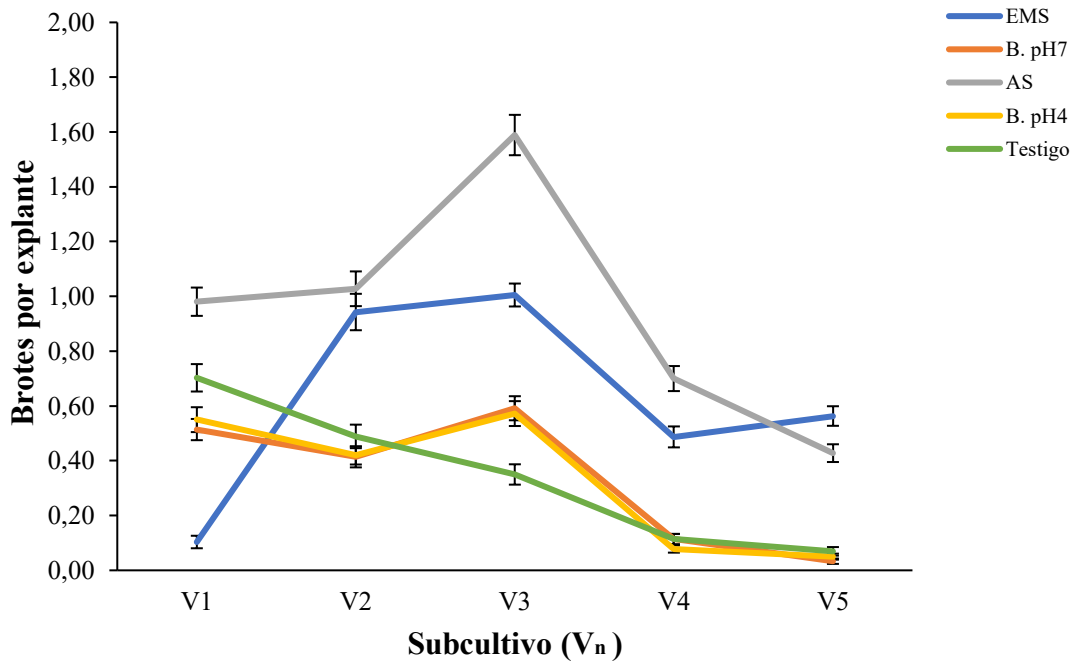


Figura 4. Número de brotes por explante de banano cv. ‘Gran Enano’, a través de cinco subcultivos. Ante la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH 4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas. 2021-2022.

Respecto al porcentaje de plantas variantes (Cuadro 4), no se encontró plántulas con variación en cuanto a su coloración o morfología durante el periodo del cultivo *in vitro*, sin embargo, durante la etapa de aclimatación y desarrollo si se encontraron este tipo de variantes. En el Anexo 11 se pueden observar las plantas con variantes clorofílicas y en el Anexo 12 las morfológicas.

Cuadro 4. Porcentaje de plantas variantes (%) de banano cv. ‘Gran Enano’, en condiciones de invernadero, tras cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH 4) y testigo de agua. Corporación bananera Nacional. 2022.

Tratamiento	Plantas variantes (%)
EMS	34,5
B. pH7	0,0
AS	5,4
B. pH4	0,0
Testigo	0,0

Los explantes tratados con EMS presentaron un mayor porcentaje de plantas variantes (34,5 %) y las tratadas con AS un 5,4 %. Las plántulas controles B. pH7, B. pH4 y testigo, no presentaron variación en su fenotipo en cuanto a la coloración y morfología (Cuadro 4).

5.2 Respuesta de plantas de banano a la exposición de inóculo de *P. fijiensis*.

Después de cuatro semanas, de exposición de las plantas al inóculo del hongo *P. fijiensis*, se obtuvo una incidencia de plantas infectadas de 99,6 % en la parcela de evaluación y luego de ocho semanas esta alcanzó el 100%.

Utilizando los criterios del Cuadro 2, indicado en materiales y métodos, se procedió a realizar los cálculos presentados en el Cuadro 5. En este se muestra los valores de la población inicial, perteneciente a cada tratamiento previo a la exposición al inóculo de *P. fijiensis*, número de plantas seleccionadas y su porcentaje en la respectiva población.

Cuadro 5. Número de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’ previo y posterior a la exposición de inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M y su valor porcentual (%), según tratamiento aplicado, etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH 4) y testigo de agua. Corporación Bananera Nacional. 2022.

Tratamiento	No. inicial de plantas	Plantas promisorias	Valor porcentual (%)
EMS	133	16	12
B. pH7	61	8	13
AS	1640	143	9
B. pH4	61	5	8
Testigo	61	6	10

Entre los agentes mutagénicos, el EMS presentó un mayor porcentaje de plantas seleccionadas siendo 12% del número inicial, por otro lado, el tratamiento AS generó un mayor número de plantas seleccionadas. Sin embargo, en términos de porcentaje fue de 9%. Los controles de buffer pH 7, pH 4 y el testigo obtuvieron un menor número de plantas seleccionadas. No obstante, respecto al número inicial previo a la selección, se obtuvo un 13%, 8% y 10%, respectivamente (Cuadro 5).

Con respecto a la variable de severidad, se calculó el área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE), con el fin de consolidar en un solo dato, los niveles de daño que se determinaron en cada fecha de evaluación. A partir de estos valores, se realizó la agrupación de las plantas según su grado de afectación, como se muestra en Figura 5.

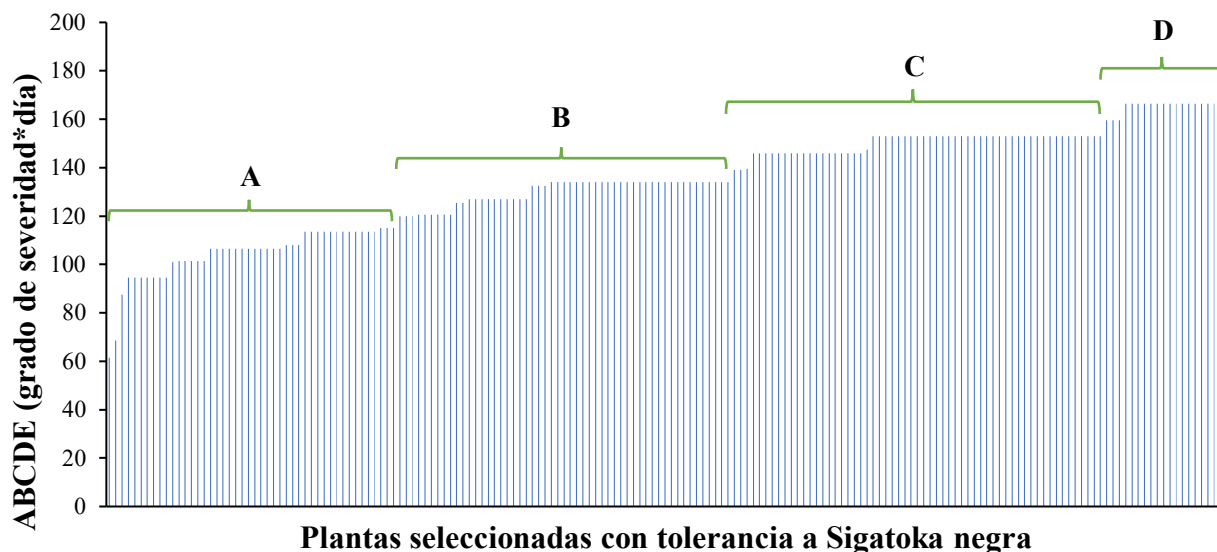
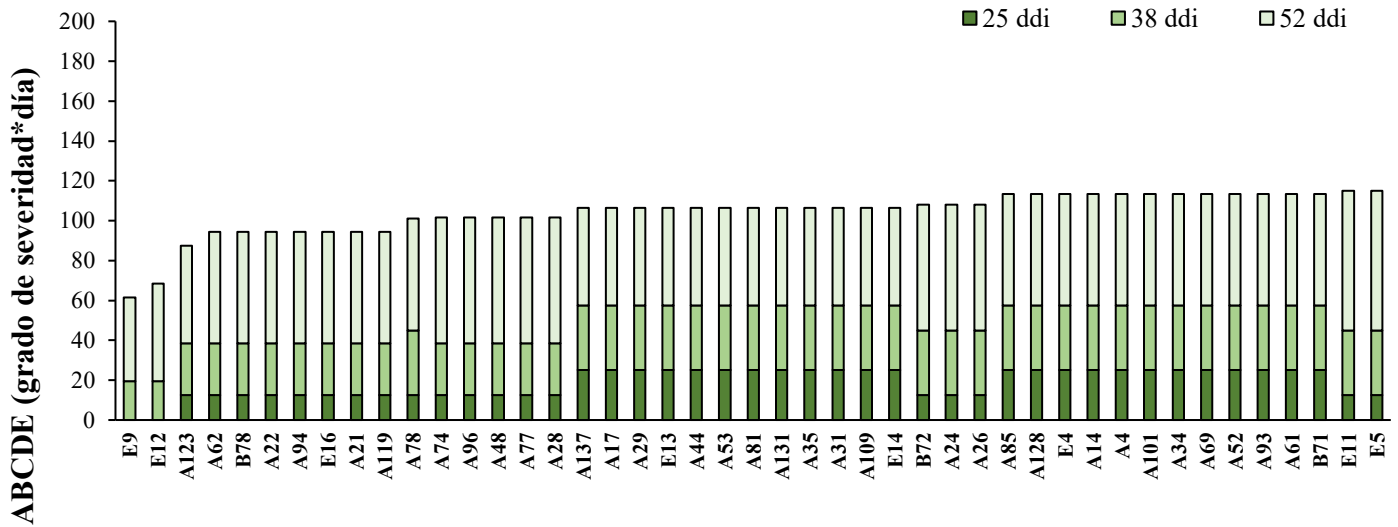


Figura 5. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad *día), de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’ seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M. Primer cuartil (A), segundo cuartil (B), tercer cuartil (C) y cuarto cuartil (D). Corporación bananera Nacional. 2022.

Se pudo observar que las plantas pertenecientes al grupo (A) obtuvieron un ABCDE acumulada de 62 a 115, el grupo (B) entre 120 y 134, el grupo (C) obtuvo valores de 139 a 153 y finalmente el grupo (D) de 159 a 167 (Figura 5).

Ahora bien, para describir la afectación que presentaron las plantas del grupo (A) a través del periodo de evaluación, se calculó el ABCDE para cada una de las fechas, las cuales se muestran en la Figura 6.

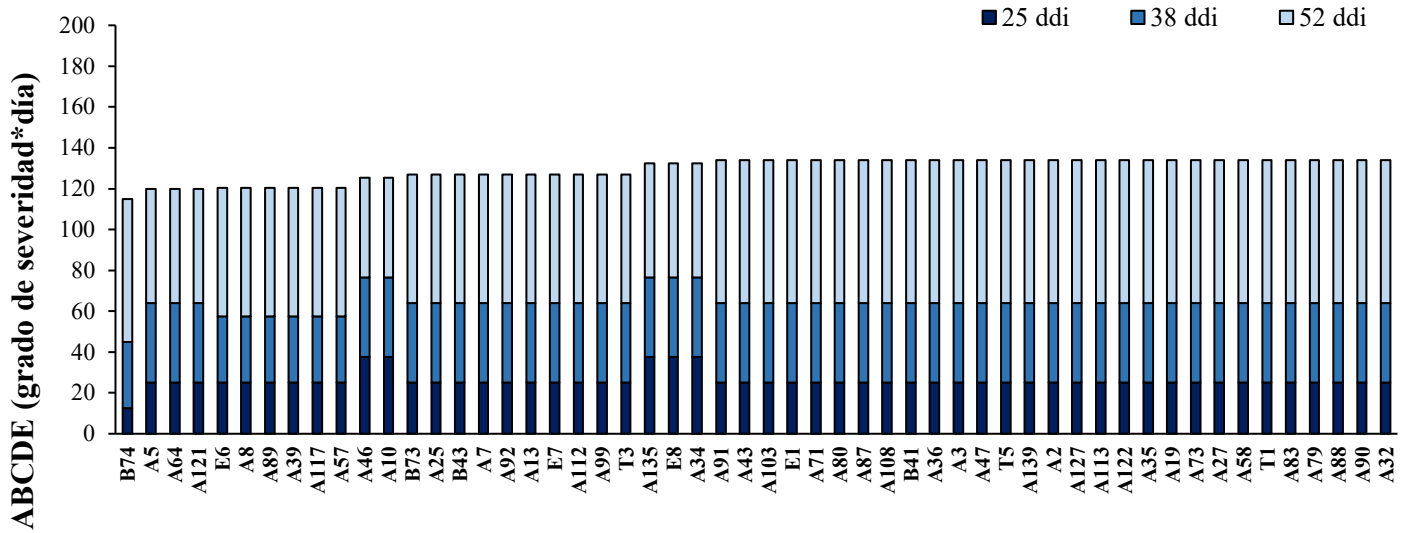


Plantas seleccionadas con tolerancia a Sigatoka negra

Figura 6. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad*día), según días después de la inoculación (ddi), de plantas banano cv. ‘Gran Enano’, pertenecientes al primer cuartil (A), de los individuos seleccionados con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M. Corporación bananera Nacional. 2022.

Como se puede observar en la figura 6, las plantas E9 y E12, no presentaron afectación por la enfermedad a los 25ddi. Cabe destacar que fue durante el periodo de 0 a los 25ddi cuando se observaron más diferencias entre los valores de afectación en las plantas. Adjunto a lo anterior, ambas plantas presentaron la menor área acumulada, siendo 62 y 69, respectivamente.

En la figura 7 se muestra el porcentaje de daño según fecha de evaluación, para cada una de las plantas pertenecientes al grupo (B).

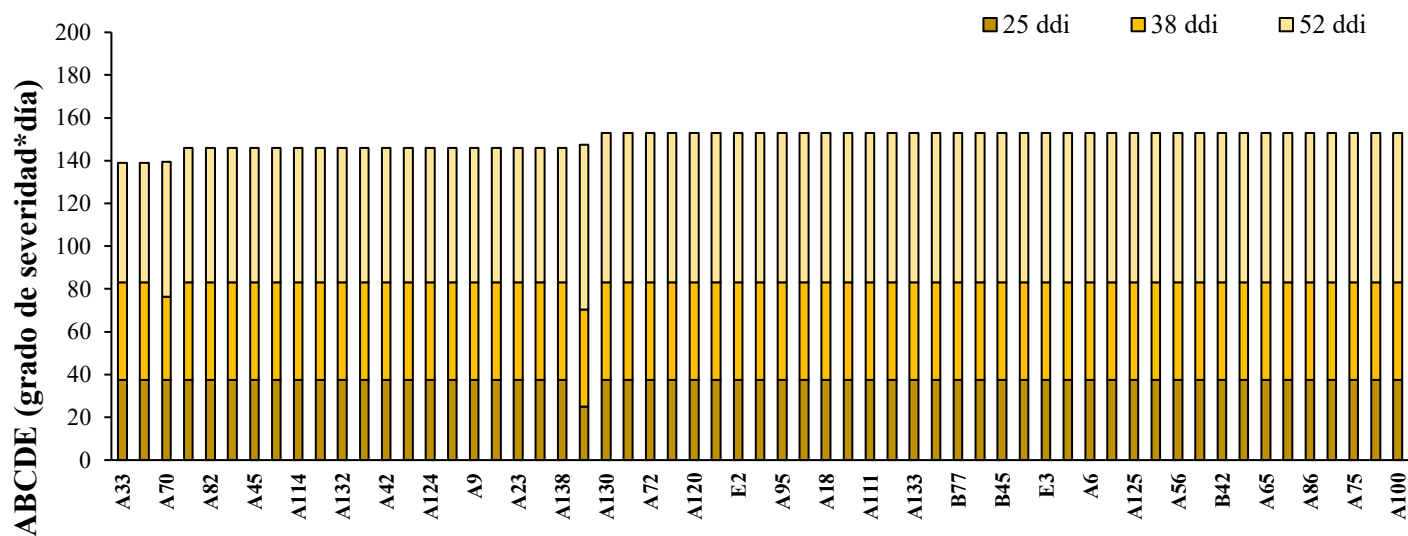


Plantas seleccionadas con tolerancia a Sigatoka negra

Figura 7. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad*día), según días después de la inoculación (ddi), de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’, pertenecientes al segundo cuartil (B), de los individuos seleccionados con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M. Corporación bananera Nacional. 2022.

Dentro del grupo (B) de las plantas seleccionadas, el área de avance de la enfermedad a los 25 ddi, presentó una mayor variación mostrando valores entre 13 y 38, a los 38 ddi fue de 32 a 39. Sin embargo, a los 52 ddi se registró que el área de afectación se encontraba entre 50 y 70, por lo que fue en este periodo en el cual se observa un mayor aumento en la severidad (Figura 7).

En la figura 8 se puede observar la evolución del daño en el tiempo para las plantas correspondientes al cuartil C.

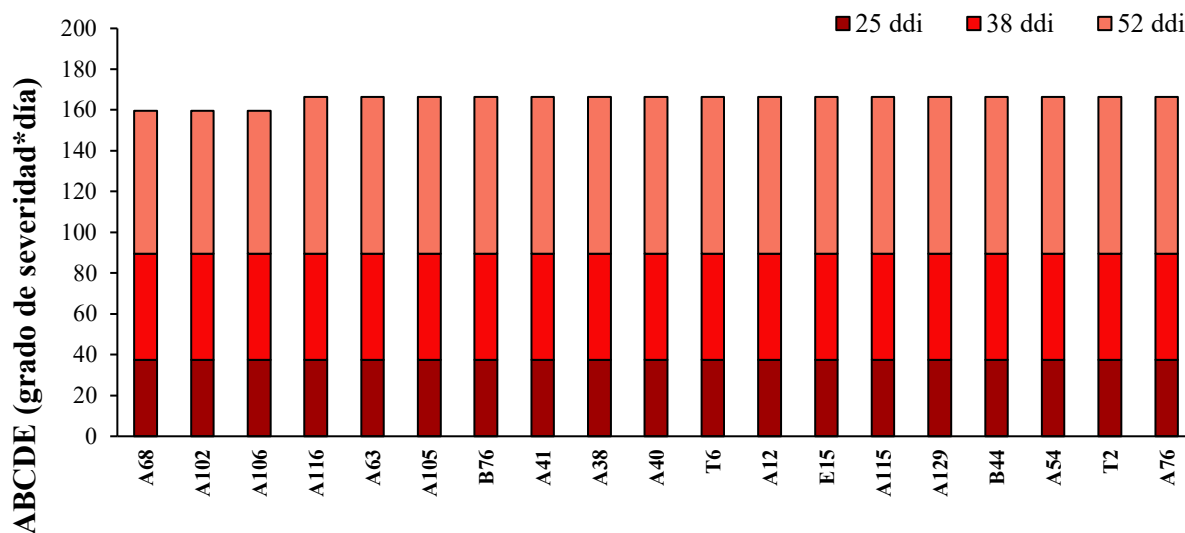


Plantas seleccionadas con tolerancia a Sigatoka negra

Figura 8. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad*día), según días después de la inoculación (ddi), de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’, pertenecientes al tercer cuartil (C), de los individuos seleccionados con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M. Corporación bananera Nacional. 2022.

Se pudo observar que el área calculada de avance de la enfermedad para el grupo (C) fue mayor respecto a los grupos (A) y (B), para cada una de las fechas, teniendo que a los 25 ddi, el área fue entre 25 y 38, a los 38 ddi de 35 a 46 y a los 52 ddi fue de 56 a 77.

La evolución del porcentaje de daño, por fecha de evaluación, de las plantas que se ubicaron en el cuartil D, se presenta en la Figura 9.



Plantas seleccionadas con tolerancia a Sigatoka negra

Figura 9. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) (grado de severidad*día), según días después de la inoculación (ddi), de plantas de banano cv. ‘Gran Enano’, pertenecientes al cuarto cuartil (D), de los individuos seleccionados con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M. Corporación bananera Nacional. 2022.

En este grupo se muestra a la población con mayor afectación por la enfermedad dentro de las plantas seleccionadas. A los 25 ddi, el área fue de 38, a los 38 ddi fue de 52 y a los 52 ddi el área fue de 70 y 77, además, entre los grupos realizados, éste fue el que presentó una mayor homogeneidad en los datos del ABCD de cada una de las plantas (Figura 9).

Para cada uno de los grupos de plantas pertenecientes a los diferentes cuartiles, se contabilizaron los individuos según tratamiento mutagénico aplicado en etapas previas de la investigación (Figura 10).

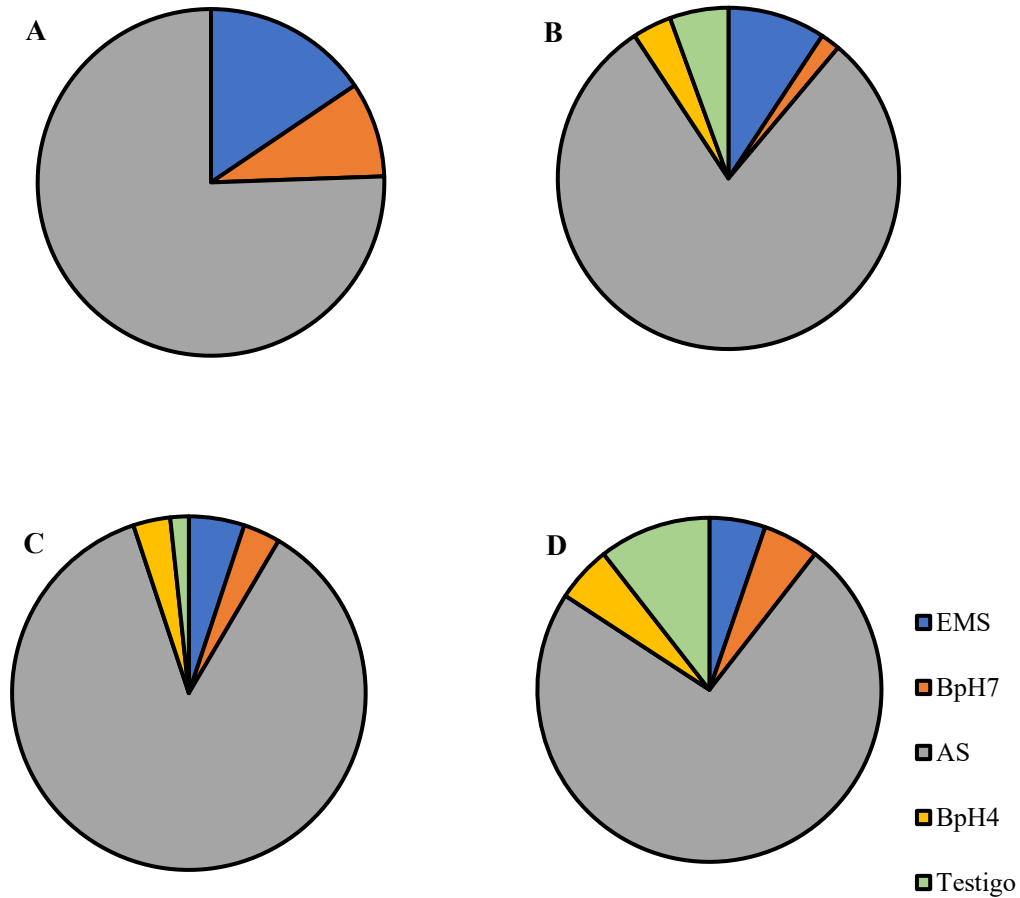


Figura 10. Composición de los grupos de plantas seleccionadas. A) primer cuartil, B) segundo cuartil, C) tercer cuartil y D) cuarto cuartil, según los tratamientos a los que fueron sometidas las plantas de banano cv. ‘Gran Enano’. Etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH 4) y testigo de agua. Corporación Bananera Nacional. 2022.

Conforme a estos resultados, se obtuvo que, en los cuatro grupos predominó la presencia de plantas tratadas con AS seguido por EMS y en menor proporción, hubo plantas pertenecientes a los controles buffer pH 7, pH 4 y el testigo. Además, se observó que el grupo (D) fue el cuartil con mayor participación relativa de los controles buffer y testigo respecto a los demás cuartiles, ya que la AS tuvo un 74%, el EMS 5%, los buffer pH 7 y pH 4 también 5% y finalmente el valor más el testigo con 11%.

Respecto a las variables de Número de hojas y HMJS, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson respecto al grado de severidad y a partir de los valores obtenidos, las relaciones fueron no concluyentes (Anexo 6).

6 Discusión

6.1 Determinación de plántulas variantes y su correlación con respecto al agente mutagénico aplicado.

Según resultados presentes en el Cuadro 3, los explantes tratados con EMS y AS presentaron una sobrevivencia de 24% y 82%, respectivamente; valores menores respecto a los controles de buffer pH7, pH4 y al testigo, donde se contabilizó 100% de plantas sobrevivientes al primero de los subcultivos. Esto concuerda con los resultados de Bhagwat & Duncan (1998), donde la sobrevivencia tras la aplicación de una sustancia mutagénica a explantes de banano, se vio disminuida. Esto puede ser resultado de errores en la replicación del ADN, que generen cambios a nivel fisiológico y metabólico que sean incompatibles con el óptimo desarrollo del organismo (FAO & OIEA, 2021).

En cuanto a las diferencias respecto a la sobrevivencia entre mutagénicos, puede ser producto de la naturaleza de cada uno, ya que el EMS, al ser una sustancia alquilante tiende a producir una alta citotoxicidad dentro de la célula. Esto genera afectación en procesos de división celular (FAO & OIEA, 2021). Este efecto de la sustancia sobre el material vegetal también se vio reflejado en el experimento de Boschini (2018), que al tratar explantes de banano con EMS 1,5M / 6 h, obtuvo una sobrevivencia inferior al 50%.

Por otro lado, la AS actúa directamente en procesos metabólicos, donde, los aniones que componen la estructura química, generan una fuerte inhibición de las bombas de protones en la célula, lo que limita la estabilidad del potencial de la membrana celular y procesos de desarrollo, a causa de una pobre producción de ATP, promotor de la mayoría de las actividades celulares (Jankowicz- Ciésłak *et al.*, 2012; Sivasankar *et al.*, 2022). Tal cual se observa en los resultados obtenidos por Saraswathi *et al.* (2016), donde al implementar la misma dosis del presente estudio, se generó una menor sobrevivencia, comparada con el testigo.

Para la variable Altura de planta, como se observó en las Figuras 1 y 2, hay relación directa entre la altura de la población tratada y los agentes mutagénicos. Esto porque los explantes tratados con AS (2,9 cm) y EMS (1,7 cm), presentaron diferencias significativas respecto a los controles y el testigo (Figura 1). Esto concuerda con la investigación realizada por Corazón-Guivin *et al.* (2022), donde trataron plántulas de *Plukenetia volubilis* con agentes mutagénicos y se pudo observar que, ante la aplicación de las sustancias, la altura en las plántulas fue menor.

También cabe destacar que, los resultados ya mencionados, mostraron una relación entre la variable Supervivencia y Altura (Cuadro 3 y Figura 1), ya que en todos los tratamientos valores de mayor a menor supervivencia coincidieron con la altura. Esto puede deberse a que, tras la aplicación de sustancias mutagénicas, tiende a presentarse perturbaciones en el ciclo celular, que puede reflejarse como efectos somáticos y expresarse fenotípicamente en retraso en el crecimiento y desarrollo de las plantas mutantes, disminución de la fertilidad, aparición de variaciones clorofílicas en el tejido vegetal y una menor supervivencia de las plantas (FAO & OIEA, 2021).

En relación con el número de brotes por explante, hubo una respuesta contraria a la de la altura, ya que los explantes tratados con los agentes mutagénicos obtuvieron un mayor número de brotes respecto a los controles y el testigo (Figura 3). En el ensayo realizado por Saraswathi *et al.* (2016), se observó lo contrario, ya que trató explantes de banano cv. 'Rasthali,' con los agentes mutagénicos etil metano sulfonato y azida de sodio y obtuvo que, con altas dosis de los mutagénicos, el número de brotes por explante fue menor, respecto a los controles.

Si bien, la literatura reporta que al emplear agentes mutagénicos tanto físicos como químicos, es esperable tener una reducción en el crecimiento y desarrollo del organismo, la respuesta que estos tengan es altamente dependiente del genotipo de la especie (Jain, 2011). Además, el nivel de ploidía del objeto en estudio posee una gran influencia en cuanto a la expresión de las mutaciones, ya que los poliploides y en específico los autopoliploides como el cultivar Gran Enano, poseen la propiedad de amortiguamiento fenotípico, que limita la capacidad de la mutación en generar un cambio que sea fenotípicamente perceptible, a causa de un posible enmascaramiento de la misma (FAO & OIEA, 2021).

Ahora bien, los resultados obtenidos para las variables Altura y Número de brotes por explante, a través de los cinco subcultivos realizados (Figura 3 y Figura 4), mostraron que para la variable Altura, del primero al tercero subcultivo (V1, V2 y V3), se presentó el mayor aumento para esta variable y a partir de este, se estabiliza durante los subcultivos restantes (Figura 3). De igual manera ocurrió con el número de brotes, ya que entre V1 y V3 se generó la mayor producción de brotes y a partir de este se dio una disminución abrupta (Figura 4).

Esta tendencia se puede asociar con lo expuesto por Jankowicz- Ciésłak *et al.* (2017) en donde este comportamiento, puede indicar que durante los primeros subcultivos fue donde se presentó una mayor variabilidad en la constitución genética de los organismos tratados y, a través de los ciclos de regeneración, la tasa de disociación de quimeras disminuyó, por lo que el material puede ya haber presentado alto grado de estabilidad genotípica en los últimos ciclos. Además, estos mismos autores mencionan que se requieren mínimo tres subcultivos para promover la disociación de quimeras y obtener un material con alto grado de homogeneidad, tal cual se observó en los resultados de la presente investigación.

Esto último, se debe a que los agentes mutagénicos químicos producen variaciones a nivel celular y se expresan inicialmente quimeras, las cuales son células o grupos de estas que poseen una diferenciación genética dentro de un organismo. Esto genera que la composición del individuo sea altamente heterogéneo, sin embargo, este fenómeno puede ser disminuido a partir de varios ciclos de propagación de meristemas apicales (Jankowicz- Ciésłak *et al.*, 2017; FAO & OIEA, 2021).

En relación a la ocurrencia de plantas variantes, como se manifestó en la sección de resultados, a lo largo del cultivo *in vitro* de los explantes, no se observó variaciones del tipo clorofílico o morfológico. Esto puede deberse al efecto de amortiguamiento fenotípico, mencionado anteriormente, ya que según Stadler, (1929), citado por FAO & OIEA, (2021), caracteres cualitativos como la coloración o forma de la hoja, tienden a expresarse en menor frecuencia en materiales con niveles de ploidía altos, caso el cultivar Gran Enano. No obstante, dichas variantes si fueron observadas en la etapa de invernadero (Cuadro 4). Ahora bien, esto puede deberse a que el estrés ambiental al que se sometieron las plántulas durante el proceso de aclimatación, activó dichas variantes que se encontraban inactivas (Lisch, 2013).

Es de resaltar que, para el tratamiento con agentes mutagénicos, la frecuencia de plantas variantes fue mayor comparado con los controles buffer pH7, pH4 y el testigo (Cuadro 4). Esto indica que ambos tratamientos fueron efectivos a la hora de generar variantes del tipo clorofílica y morfológicas. Además, se observó que hubo diferencias entre la AS y el EMS en cuanto a la generación de plantas variantes, teniendo un 5,4% y 34%, respectivamente.

En este caso, para ambos agentes mutagénicos el mecanismo de acción es distinto. El EMS produce mutaciones aleatorias en el genoma por medio de la adición de grupos alquilo generalmente en la guanina, esto genera un cambio en la conformación de dicha base que a la hora de la replicación, las enzimas involucradas no reconocen a esta estructura y genera que se adicione una timina como base complementaria, este cambio de apareamiento ocasiona un cambio en la información genética del organismo, lo cual se va a ver reflejado en mutaciones que pueden resultar en variabilidad (Rojas *et al.*, 2016).

En cambio, la acción mutagénica de la azida de sodio, es debido a la síntesis de un metabolito orgánico, análogo al aminoácido L-azidoalanina, que facilita la permeabilidad de la membrana del núcleo, por lo que promueve el paso de la sustancia a través de esta e interactúa directamente con el ADN, generando mutaciones puntuales en el genoma lo que genera una modificación en la estructura de los aminoácidos y se refleja en una alteración de las funciones metabólicas que a su vez, puede ocasionar cambios en el desarrollo de la planta. Gracias a su alta tasa en generación de variaciones puntuales disminuye significativamente la probabilidad de la ocurrencia de mutaciones aberrantes (Benito, 2019).

6.2 Respuesta de plantas de banano tras exposición a inóculo de *P. fijiensis*.

En relación con la incidencia de la enfermedad en las plantas de banano cultivar Gran Enano, como se indicó en la sección de resultados, esta fue un 100%. Esto concuerda con lo mencionado por Marín *et al.* (2003), quienes indican que la susceptibilidad del Gran Enano a esta enfermedad, genera que alcance altos porcentajes de incidencia, pese a los esfuerzos en plantación para controlarla. Esto relacionado a la alta patogenicidad, fácil dispersión y corto ciclo de reproducción del patógeno, favorecido por las condiciones climáticas de las zonas productoras.

Además, se debe mencionar que el régimen de clima imperante en la zona donde se desarrolló la etapa de campo, cuenta con promedios de precipitación anual entre 1700 mm a 5500 mm, y temperaturas superiores a los 25°C durante todo el año (Guzmán-Álvarez & Guzmán, 2014). Esto favorece, por un lado, la mojadura foliar, necesaria para promover la germinación de esporas y facilitar la penetración de las hifas del hongo a través de los estomas y por otro, a acentuar la infección y el desarrollo, ya que el hongo acelera su ciclo reproductivo bajo temperaturas cálidas (Marín *et al.*, 2003).

En relación a la severidad descrita en la Figura 5, se pudo observar diferentes valores de área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE) en las plantas seleccionadas. Esto puede relacionarse, a que los eventos de mutación que resultan en algún nivel de resistencia a un factor biótico, pueden mostrarse como una resistencia específica, también conocida como vertical. Esta genera que el hospedero no presente afectación hacia una cepa o raza de un organismo fitopatógeno. Además, se caracterizan por ser monogénicas, es decir que solo involucra un gen de resistencia, esto genera que sea fácil de romper, debido a la alta tasa evolutiva de los patógenos (Van der Plank, 1975, citado por Burbano-Figueroa, 2020; FAO & OIEA, 2021).

Por otro lado, se encuentra la resistencia horizontal o no específica. Esta es de carácter poligénico, por lo que el cambio se rige por la actividad de varios genes, que pueden estar involucrados en una variación a nivel metabólico que desencadene una serie de señales producto de la interacción hospedero-patógeno y estas se reflejen en procesos que amortigüen el daño que el patógeno pueda ocasionar. Al no ser específicas por cepa, tienden a ser más difíciles de romper (Van der Plank, 1975, citado por Burbano-Figueroa, 2020; FAO & OIEA, 2021).

Si bien, no se puede comprobar que este sea el caso, existen mecanismos mediante los cuales las plantas pueden tolerar la enfermedad, algunos de estos son a nivel bioquímico, como una mejor respuesta al estrés oxidativo mediado por una mayor adaptabilidad ante la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) producida por la interacción de *P. fijiensis* con la planta. También se ha reportado características morfológicas y anatómicas como menor densidad estomática, mayor emisión foliar y cutícula más gruesa, que pueden otorgarle a la planta mejor adaptabilidad ante eventos de infección de patógenos (FAO & OIEA, 2021).

Si bien, no se midió densidad estomática o espesor de cutícula, a nivel de campo, se pudo observar que hubo plantas que presentaron un mayor número de hojas respecto a otras, esto puede ser indicador de un cambio a nivel fisiológico o metabólico, expresado en una mayor emisión foliar, favoreciendo el amortiguamiento de la agresividad de la infección en las plantas (Anexos 7, 8, 9 y 10).

Otro factor a considerar, con relación al bajo porcentaje de plantas seleccionadas, respecto a la cantidad inicial de plantas, es que la mutagénesis química, al generar cambios aleatorios en el ADN, existe la probabilidad que este se dé en una sección del genoma no relacionado a la resistencia de la enfermedad o puede darse un evento de mutación silenciosa, esto quiere decir que ocurrió un cambio en un nucleótido, sin embargo, la secuencia no genera una alteración en la síntesis de aminoácidos o proteínas, por tanto el cambio no es perceptible. Además, existe la probabilidad de no haber ocurrido algún evento de variación, puesto que los agentes mutagénicos aumentan la frecuencia de mutaciones, mas no las garantiza (Burbano-Figueroa, 2020; FAO & OIEA, 2021; Jankowicz- Ciésłak & Ingelbrecht, 2022).

Ahora bien, respecto al avance de la enfermedad a través del periodo de evaluación en las plantas seleccionadas, se observó que la principal diferencia entre los grupos se dio a los 25 ddi (Figuras 6,7,8 y 9). Las plantas que presentaron una menor ABCDE acumulada, a su vez fueron las que presentaron el menor valor para esta evaluación.

Esta tendencia puede ser causa de una respuesta de adaptación de las plantas en interacción con el patógeno y que se exprese en un cambio involucrado con el periodo de incubación del hongo dentro del huésped, especialmente aquellos materiales que presentaron un área entre los 0 y 35 para los 25 ddi. El periodo de incubación es aquel desde que se da la infección, hasta que aparece el primer síntoma de Sigatoka negra (OIEA, 2010).

Esto coincide con lo mencionado por Cedeño-García *et al.* (2017) que evaluaron el comportamiento de híbridos de banano FHIA que son parcialmente resistentes, respecto al cultivar Gran Enano, que es altamente susceptible y encontraron de igual manera que en la presente investigación, las plantas que presentan una mayor resistencia a la enfermedad son aquellas que poseen un mayor periodo de incubación.

A partir de la agrupación de las plantas seleccionadas, se pudo observar que el grupo (A) en su mayoría se conformó por plantas que fueron tratadas con agentes mutagénicos (Figura 10.A), sin embargo, en los demás grupos, a mayor avance de la enfermedad, se encontraban más plantas que pertenecían a los controles buffer y al testigo (Figura 10).

En primera instancia, la presencia de más plantas provenientes del tratamiento con agentes mutagénicos, puede ser producto de una mayor adaptabilidad y respuesta genética de la planta frente a factores bióticos (Burbano-Figueroa, 2020).

Sin embargo, lo segundo observado puede ser producto de eventos de variación somaclonal. Este fenómeno se da principalmente a raíz de múltiples ciclos de propagación *in vitro*, como fue el caso del presente ensayo, de donde las mutaciones obtenidas pueden mantenerse e inclusive ser heredables, por lo que es considerado un método más por el cual se puede obtener variabilidad (Sahijram *et al.*, 2003). Sin embargo, Jacome *et al.* (2002) destacan que muchos de estos eventos son potenciados por la epigenética o por la presión que esté ejerciendo algún organismo de origen biótico.

Además de los múltiples ciclos de propagación *in vitro*, otro factor que puede aumentar las probabilidades de un evento de esta índole es la implementación de fitohormonas, en especial aquellas que sean promotoras de la división celular, como las citoquininas, en especial la 6-BAP, que fue adicionada al medio de cultivo como fue descrito en la sección de Materiales y Métodos. Si bien, esta no es considerada un agente mutagénico, es un fuerte potenciador de la tasa de división de las células, que a su vez promueven la diferenciación, por lo que las posibilidades de obtener una variación somaclonal también incrementan (Jacome *et al.*, 2002).

Finalmente se debe mencionar el aporte de Sahijram *et al.* (2003), quienes mencionan que, debido a la naturaleza genómica del banano, este tipo de variaciones son frecuentes tras superar los cinco subcultivos, teniendo que, en términos generales, el banano puede presentar en promedio un 6% de variación somaclonal, inclusive se menciona que comercialmente es permitido hasta un 10%. Además, determinaron que en cultivares Cavendish se encontró este tipo de evento en una tasa del 6 al 38%, lo cual puede relacionarse con la presencia de plantas control buffer y testigo dentro de las plantas seleccionadas.

7 Conclusiones

1. Los tratamientos con los agentes mutagénicos EMS y AS, fueron efectivos para la generación de variabilidad en plantas de banano cultivar Gran Enano. Se contabilizó un 34% de plantas variantes para el EMS y un 5% para la AS de sus respectivas poblaciones.
2. Entre los agentes mutagénicos, a nivel *in vitro*, el EMS generó la menor sobrevivencia (24%) y una menor altura (1,7 cm), respecto a los demás tratamientos.
3. La AS generó la mayor brotación *in vitro* en diferentes subcultivos, donde se alcanza el máximo en el tercero de ellos (1,6 brotes por explante), ocasionando que fuera el tratamiento con mayor población en campo abierto, con 1640 plantas.
4. Las dosis ensayadas de los agentes mutagénicos EMS (0,15M/ 6h) y AS (0,003M/1h), permitió la generación de plantas variantes con una menor severidad hacia sigatoka negra en campo, con un ABCDE de 61 a 167.

8 Recomendaciones

1. La generación de variación de los agentes mutagénicos sobre un material vegetal es estrictamente dependiente de la concentración, dosis y genotipo del organismo a tratar. En términos de generación de variabilidad la AS presentó valores más bajos. Por lo que es recomendable realizar curvas dosimétricas, para ajustar la dosis y tiempo de exposición de este agente mutagénico al cultivar Gran Enano (Musa AAA), ya que las dosis recomendadas empleadas en el ensayo se tomaron a partir de una investigación realizada en banano cultivar Rasthali (Grupo AAB).
2. Tener en consideración la cantidad de ciclos de reproducción que posee el material vegetal en la etapa de multiplicación previo a tener la población inicial a ser con agentes mutagénicos. Esto, debido a que el banano cultivar Gran Enano, posee una

alta tasa de generación de variaciones somaclonales, la cual puede aumentar a mayor número de ciclos de cultivo *in vitro*.

3. En la etapa de evaluación en campo, incluir las variables Número de hojas (considerando el estado de desarrollo de la hoja candela) y Hoja más joven con síntoma (HMJS) desde el inicio de la evaluación, previo a la exposición de inóculo de *P. fijiensis*, manteniendo a su vez la trazabilidad según material evaluado. Esto con el fin de determinar parámetros como emisión foliar, periodo de incubación y periodo de latencia de la enfermedad que pueden ser valiosos, en vías de realizar una selección más detallada en cuanto a la afectación por Sigatoka negra.
4. Posterior a este ensayo, es recomendable medir variables de producción, para afinar la selección a un grupo de plantas que posean la mejor respuesta en cuanto a la infección por Sigatoka negra y a su vez cumpla con los parámetros de producción.
5. Una vez realizada la selección, considerando parámetros de producción, es necesario a partir de las plantas promisorias, generar líneas, las cuales a futuro permitan desarrollar ensayos que cuenten con repeticiones para evaluar el comportamiento de cada una de estas con fundamento estadístico.

9 Referencias bibliográficas

- Abdulhafiz, F., Kayat, F. & Zakaria, S. (2018). *Gamma irradiation effect on the growth of Musa cv. Tanduk (AAB)*. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 6(2), 135-142. <https://www.asianjab.com/wp-content/uploads/2018/06/1.-OK-Gamma-irradiation-effect-on-the-growth-of-musa-cv.-Tanduk-AAB-4.pdf>
- Alfaro, F. (2019). *Estudio genético de la Resistencia a las estrobirulinas en aislamientos de Pseudocercospora fijiensis de plantaciones de banano en Costa Rica*. [tesis de maestría, Universidad de Costa Rica]. Repositorio kérwá de la Universidad de Costa Rica. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/79163>

- Alvarado-Capó, Y., Leiva-Mora, M., Dita-Rodríguez, M.A., Acosta, M., Cruz, M., Portal, N., Gómez-Kosky, R., García, L., Bermúdez, I. & Padrón J. (2002). *Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of Mycosphaerella fijiensis*. Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Álvarez, E., Pantoja, P., Gañán, L & Ceballos, G. (2013). *Estado del arte y opciones de manejo del Moko y la Sigatoka negra en América Latina y el Caribe*. Centro Internacional de Agricultura Tropical & Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/3/as124s/as124s.pdf>
- Amorim, E., Dos Santos, J., De Oliveira, V. & De Oliveira, S. (2016). *Melhoramiento genético. Em fortes C. O Agronecio de banana*. (EMBRAPA). 171-194 p.
- Arteaga-Alcívar, F. (2015). *Origen y evolución del banano*. Universidad Nacional de Colombia. <https://www.academia.edu/24138727/2015-I-UNIVERSIDAD-NACIONAL-DE-COLOMBIA-ORIGEN-Y-EVOLUCI%C3%93N-DEL-BANANO>
- Arzate- Vega, J., Michel-Aceves, A.C., Domínguez-Márquez & V.M., Santos-Eméstica, O.A. (2006). *Antagonismo de Trichoderma spp. sobre Mycosphaerella fijiensis Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del plátano (Musa sp.) in vitro e invernadero*. Revista Mexicana de fitopatología, 24(2), 98- 104.
- Benavides- López, L. F. (2019). *Cuantificación temprana de Pseudocercospora fijiensis por medio de qPCR en modelos predictivos de Sigatoka negra en plantas de banano (Musa AAA)*. [tesis de licenciatura, Tecnológico de Costa Rica]. Repositorio TEC. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/10838/Cuantificaci%C3%B3n%20temprana%20de%20Pseudocercospora%20fijiensis%20por%20medio%20de%20qpcr%20en%20modelos%20predictivos%20de%20Sigatoka%20negra%20en%20plantas%20de%20banano%20%28Musa%20AAA%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Benavides- Silva, J.M. (2018). *Evaluación de tres variedades de banano (Musa acuminata) con tres densidades sobre su rendimiento. Valle del medio Piura*. [tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Piura]. Repositorio UNP. <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/1261/AGR-JOS-MAN-18.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Benito, M.G. (2019). *Modificaciones de la estructura genética de trigo (Triticum aestivum L.) por inducción mutagénica con Azida de sodio* [tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Huanca Ancavelica]. Repositorio Institucional. <http://repositorio.unh.edu.pe/handle/UNH/3061>
- Bhagwat, B. & Duncan, E. J. (1998). *Mutation breeding of banana cv. Highgate (Musa spp., AAA Group) for tolerance to Fusarium oxysporum f. sp. cubense using chemical mutagens*, *Scientia Horticulturae*, 73(1), 11–22. [https://doi.org/10.1016/s0304-4238\(97\)00141-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4238(97)00141-6)
- Boschini- Castillo, A. S. (2018). *Mutagénesis química para la obtención de plantas del cv. 'Gros Michael' (Musa AAA) resistentes a la raza 1 de Fusarium oxysporum f.sp. cubense*. [tesis de licenciatura, Tecnológico de Costa Rica]. Tesis física.
- Burbano-Figueroa, O. (2020). *Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal*. *Revista Argentina de microbiología*, 52(3), 245- 255. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.04.006>
- Calderón, K. F. (2019). *Efecto del ácido abscísico en banano de exportación (Musa AAA var. 'Gran Enano' , en Valle de la Estrella, Limón, Costa Rica*. [tesis de licenciatura, Tecnológico de Costa Rica]. Repositorio TEC. https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/11153/efecto_del_%C3%A1cido_absc%C3%ADsico_en_banano_de_exportaci%C3%B3n_%28Musa%20AAA%20var.%20Gran%20Enano%29_en_Valle%20de_%20la_estrella_Lim%C3%B3n_Costa_Rica.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Camayo, J.A. (2015). *Estado actual del mejoramiento genético del plátano y el banano* [tesis de licenciatura, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. Repositorio UNAD. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/3610>
- Cedeño-García, G., Suarez-Capello, C., Vera-Coello, D., Fadda, C., Jarvis, D., & de Santis, P. (2017). *Detección temprana de resistencia a Mycosphaerella fijiensis en genotipos locales de Musáceas en Ecuador*. *Scientia Agropecuaria*, 8(1), 29-42. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.03>
- Corporación Bananera Nacional. (s.f). *Industria bananera de Costa Rica*. Consultado el 25 noviembre del 2022. <http://www.corbana.co.cr/#banano-cr>
- Corazón-Guivin, M., Arévalo-Rojas, M., Acosta-Córdoba, R., Valverde-Iparraguirre, J., Ruiz-Sánchez, M., Cerna-Mendoza, A., Guerrero-Abad, J. & Chirinos-Hinojosa, D. (2022). *Determinación de la DL50 de Metanosulfonato de Etilo (EMS) para la inducción de cambios morfológicos y fisiológicos en plántulas de Plukenetia volubilis*. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 2(1). <https://doi.org/10.51252/raa.v2i1.209>
- Cuéllar, A., Álvarez, C.E. & Castaño, J. (2011). *Evaluación de resistencia de genotipos de plátano y banano a la Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet.)*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(1), 5853-5865. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ20220170009>
- Díaz, B.J. (2015). *Ploidía de mutantes de banano (Musa acuminata AAA) tratados con rayos gamma y etilmetanosulfonato, mediante citometría de flujo* [tesis de licenciatura, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil]. Repositorio Digital UCSG. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/3870>
- Galán, V., Rangel, A., López, J., Pérez, J.B., Sandoval, J. & Souza, H. (2018). *Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(4), e-574. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452018574>

- Galindo, J. (1993). *Comparación de tres métodos cuantitativos para evaluar el desarrollo y control de epidemias en plantas*. Instituto Colombiano Agropecuario. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/32054>.
- García-Regalado, J., Marcillo-Plaza, A. & Palacios-Sánchez, C. (2019). *Threats of leaf spots of Sigatoka (Mycosphaerella spp.) in sustainable ecuadorian banana production*. *Revista Verde*, 14(5), 591-596. <https://doi.10.18378/rvads.v14i5.6623>
- Gauhl, F. (1989). *Epidemiología y ecología de la Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet) en plátano (Musa sp.) en Costa Rica*. Unión de Países Exportadores de Banano, Ciudad de Panamá (Panamá). 114 P.
- Guzmán, M. (2002). *Situación de la Sigatoka negra en Costa Rica y opciones para el manejo de la enfermedad*. *Memorias XV reunión, Cartagena de Indias ACORBAT*. Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA.
- Guzmán -Álvarez, J.A. & Guzmán, M. (2014). *CORBANA-BANACLIMA: A weather monitoring system to support the production of banana in CORBANA-BANACLIMA: A weather monitoring system to support the banana production in Costa Rica*. *World Conference on Computers in Agriculture and Natural Resources*.
- Guzmán, M., Orozco, M. & Pérez, L. (2013). *Las enfermedades Sigatoka de las hojas del banano: dispersión, impacto y evolución de las estrategias de manejo en América latina y el Caribe*. 98-116. En: XX Reunión Internacional ACORBAT (2013, Brasil).
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M.E., López, P.A., Gómez-Sanabria, J.M. & Morales-García, J.L. (2019). *La mutagénesis en el mejoramiento de plantas ornamentales*. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 25(3), 151-167. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2018.12.022>.
- Heslop-Harrison, J. S. & Schwarzacher, T. (2007). *Domestication, Genomics and the Future for Banana*. *Annals of Botany*, 100(5), 1073–1084. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm191>

- Jacome, L., Lepoivre, P., Marín, D., Ortiz, R., Romero, R. & Escalant, J.V. (2002). *Mycosphaerella leaf spot diseases of banana: present status and outlook*. Proceedings of the workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica on May 2002. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, Francia.
- Jain, S.M. (2010). *In Vitro Mutagenesis in Banana (Musa spp.) Improvement*. *Acta Hort*, (879), 605-614. <https://doi:10.17660/actahortic.2010.879.67>
- Jain, S.M. (2011). *In Vitro Mutagenesis in Banana (Musa spp.) Improvement*. *Acta Horticulturae*, (879), 605-614. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.879.67>
- Jankowicz-Cieslak, J., Huynh, O.A., Brozynska, M., Nakitandwe, J., & Till, B.J. (2012). *Induction, rapid fixation and retention of mutations in vegetatively propagated banana*. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 1056–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00733.x>
- Jankowicz-Cieślak, J., Tai, T.H., Kumlehn, J., & Till, B.J. (2017). *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding. Protocols*. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45021-6>
- Jankowicz-Cieślak, J. & Ingelbrecht, I.L. (2022). *Efficient screening techniques to identify mutants with TR4 resistance in banana*. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-64915-2>
- Larrea, J.A. (2020). *Elaboración de un manual fitosanitario de las principales enfermedades de banano (Musa × paradisiaca L.), en Baba, Los Ríos, Ecuador*. [tesis de licenciatura, Escuela Agrícola Panamericana de Zamorano]. Repositorio Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/items/77a7c6d6-6a9c-4336-b806-7eb64c8f0727>
- Lee, L.S., Till, B.J., Hill, H., Huynh, O.A. y Jankowicz-Cieslak, J. (2014). *Mutation and mutation screening*. *Cereal genomics: methods and protocols*, 77–95.
- Leiva- Mora, M. (2006). *Mejoramiento genético tradicional y empleo de técnicas biotecnológicas en la búsqueda de resistencia frente a los principales patógenos*

fúngicos de Musa spp. Biotecnología Vegetal, 6(3), 131- 147.
<https://revista.ibP.co.cu/index.php/BV/article/view/414/713>

Lisch, D. (2013). *How important are transposons for plant evolution? Nature Reviews Genetics volume*, 14(1): 49-61. <https://doi.org/10.1038/nrg3374>

López, S.P. & Castaño, J. (2019). *Manejo integrado del mal de Panamá Fusarium oxysporum Schlechtend.: Fr. sp. cubense (E.F. SM.) W.C. Snyder & H.N. Hansen: una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2).
<https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1240>

Marín, D.H., Romero, R.A., Guzmán, M. & Sutton, T.B. (2003). *Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. Plant Disease* 87(3): 208-222.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.208>

Martínez, G.E., Rey, J.C., Pargas, R.E. & Enrique, E. (2020). *Marchitez por Fusarium raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. Agronomía Mesoamericana*, 31(1), 259-276. <https://doi:10.15517/am.v31i1.37925>

Ministerio de Comercio Exterior. (2021). *Análisis sobre la evolución del comercio exterior e IED en Costa Rica: en 2021*. Consultado el 02 abril del 2023.
www.comex.go.cr/media/9382/ana-lisis-sobre-la-evolucion-del-comercio-exterior-e-ied-en-costa-rica-2021.pdf

Moposita, J.L. (2018). *Campaña de control de Sigatoka Negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet) en la Hacienda la Elvira del año 2017*. [tesis de grado, Universidad Técnica de Babahoyo]. Repositorio UTB. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/5168>

Muharram, A., Ghulam, S.N., Muhammad, T.K., Shafquat, Y., Asma, S., Imiaz, A.K., Muhammad, R.N., Faiza, N., Mohammad, A.S., & Mazhar, A.K. (2020). *Implications of in vitro mutagénesis in banana (Musa spp.)*. *Pure and Applied Biology*, 9(1), 20-26. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2020.90003>

- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). *A revised médium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nakayama, H.D., González, M.C., Oggero, A.S., Britos, R.M., Mussi Cataldi, C., Cantero, F.A., Venancio Benítez, J., Peralta López, I. (2018). *Fitomejoramiento participativo del KA'A HE'E*. Universidad Nacional de Asunción, 50P.
- Novak, F.J. (1992). *Biotechnology of perennial fruit crops. Musa (bananas and plantains)* (pP.449-488). Plant Breeding Unit, IAEA Laboratories, Seibersdorf, Vienna, Austria.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2016). *Todo sobre los bananos: lo que debería saber acerca de esta fruta tropical*. <http://www.fao.org/zhc/detail-events/es/c/447827>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2021, 23 de enero). *Panorama general de la producción y comercio del banano en Costa Rica*. <http://www.fao.org/3/y5102s/y5102s04.htm#bm04.3>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura & Organismo Internacional de Energía Atómica. (2021). *Manual de mejoramiento por mutaciones*. 3ª ed. Viena, FAO. <https://doi.org/10.4060/i9285es>
- Organismo Internacional de Energía Atómica. (2010). *Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases*. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.
- Orozco, M., García, K., Manzo, G., Guzmán, S., Martínez, L., Beltrán, M., Garrido, E., Torres, J. & Canto, B. (2013). *La Sigatoka negra y su manejo integrado en banano*. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México.
- R Core Team (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

- Ramírez, M., Neuman, B.W. & Ramírez, C.A. (2020) *Bacteriophages as promising agents for the biological control of moko disease (Ralstonia solanacearum) of banana*, *Biological Control*, vol. 149. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104238>
- Rojas, L., Collado, R., León, A., Rivera, L., Ocaña, B., Hernández, M., Veitía, N., Martirena, A., Torres, D. & García, L.R. (2016). *Concentración óptima de Metano Sulfonato de Etilo en (Phaseolus vulgaris L.) cv. 'DOR 364' para inducir variaciones fenotípicas*. *Biotecnología Vegetal*, 16(3), 179 – 188. <https://revista.ibP.co.cu/index.php/BV/article/view/526>
- Sandoval-Fernández, J.A. & Müller, L. 1999. *Anatomía y morfología de la planta de banano (Musa AAA)*. *Revista Corbana*, 24(51): 43-59. www.musalit.org/seeMore.php?id=6554
- Saraswathi, M.S., Kannan, G., Uma, S., Thangavelu, R. & Backiyarani. (2016). *Improvement of banana cv Rasthali (Silk AAB) against Fusarium oxysporum f.sp cubense (VCG0124/5) through induced mutagen: Determination of LD₅₀ specific to mutagen, explants, toxins and in vitro and in vivo screening for Fusarium wilt resistance*. *Indian journal of Exeperimental biology*. 54 (1), 345- 353. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319054/>
- Sahijram, L., Soneji, J.R. & K.T. Bollamma. (2003). *Analyzing Somaclonal Variation in Micropropagated Bananas (Musa spp.)*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 39(6), 551–556. <http://www.jstor.org/stable/4293667>
- Simón, F.A. & Pérez, L.F. (2021). *Tácticas estratégicas para el manejo integrado de plagas y enfermedades en banano*. *Brazilian Journal of Animal and Enviromental Research*. 4 (4), 4973- 5000. <https://doi.org/10.34188/bjaerv4n4-014>
- Sivasankar, S., Ellis, N., Jankuloski, L. & Ingelbrecht, I. (2022). *Mutation breeding, genetic diversity and crop adaptation to climate change*
- Soto, M. (2015). *Bananos II: tecnologías de producción*. Cartago: Editorial Tecnológica de Costa Rica.

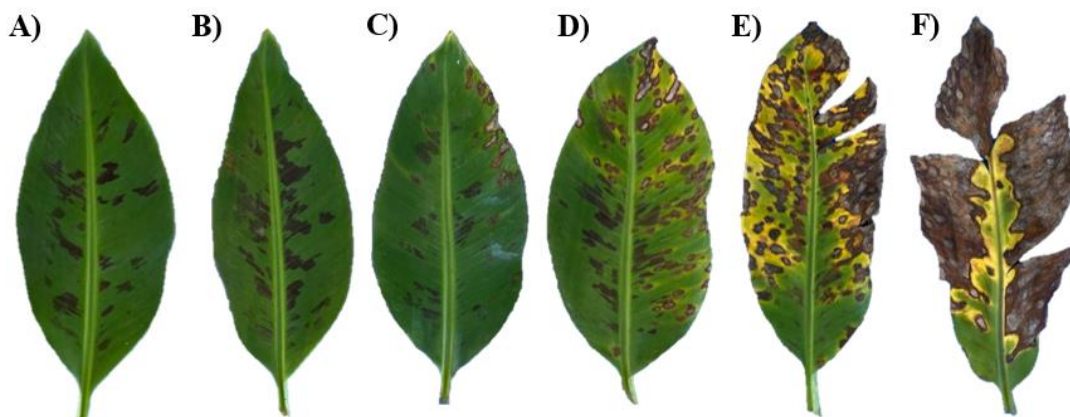
- Stadler, V. (1929). Papers of Victor Stadler. [manuscrito].
- Stover, R.H. 1980. *Sigatoka leaf spot of banana and plantains*. *Plant Disease*, (64), 750- 756.
- Torres, J. & Sandoval, J. (2020). *Mejoramiento genético convencional en el cultivo del banano (Musa AAA), subgrupo Cavendish, y plátano (Musa AAB): Una revisión crítica*. *Revista científica de la Corporación Bananera Nacional*, 46 (66), 97- 128.
- Valarezo-Pacheco, A.V. (2015). *Detección temprana de mutantes de banano tolerantes o resistentes a Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis, Morelet) en condiciones de vivero*. [tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Universidad Técnica de Babahoyo. DSpace UTB. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/1073/T-UTB-FACIAG-AGROP-000046.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vargas-Céspedes, A., Watler, W., Morales, M. & Vignola, R. (2017). *Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en el cultivo de banano en Costa Rica*. Fondo de Adaptación. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/reduccion-impacto-por-eventos-climaticos/Informe-final-Banano.pdf>
- Vargas-Segura, C. (2016). *Generación de un protocolo para inducir variantes genéticas en café (Coffea arabica L.) mediante inducción de mutaciones con el uso de agentes químicos* [tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio del SIBDI-UCR. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/3896>
- Xu, C.X., Xiao, J., He, J.G., Hu, G.B. & Chen, H.B. (2011). *The effect of ethyl methane sulphomate (EMS) and sodium azide (AS) on plant regeneration capacity of an embryogenic cell suspension of 'Yueyoukang 1' (Musa, AAA), a Banana cultivar resistant to Fusarium Wilt*. *Acta Horticulturae*, (897). <https://10.17660/ActaHortic.2011.897.41>

10 Anexos

Anexo 1. Grados de la escala de Stover (1980) modificada por Gauhl (1989), para evaluar la severidad de la Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis* M) en banano cv. ‘Gran Enano’. Tomada de Arzate-Vega *et al.* (2006).

Grado	Descripción del daño
1	Hasta 10 manchas por hoja
2	Menos del 5% de área foliar enferma
3	De 6% al 15% de área foliar enferma
4	De 16% al 33% de área foliar enferma
5	De 34% al 50% de área foliar enferma
6	Más del 50% de área foliar enferma

Anexo 2. Escala visual de grados de Stover (1980) modificada por Gauhl (1989), para evaluar la severidad de la Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*) en plántulas de banano (*Musa AAA*). A) Grado 1, B) Grado 2, C) Grado 3, D) Grado 4, E) Grado 5 y F) Grado 6.



Anexo 3. Análisis de varianza para la variable Sobrevivencia (%) en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, al primer subcultivo posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas.

```
Response: sobrevivencia
      Df  Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
repeticion  5    271.6     54.3  0.6743    0.6477
tratamiento  4 25746.1   6436.5 79.9158 5.216e-12 ***
Residuals  20   1610.8     80.5
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Anexo 4. Análisis de varianza para la variable Altura promedio (cm) en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, durante cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas.

```
Response: altura
      Df  Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
repeticion  5  0.1999  0.0400   1.2561    0.321
tratamiento  4 23.0741  5.7685 181.2110 2.091e-15 ***
Residuals  20  0.6367  0.0318
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Anexo 5. Análisis de varianza para la variable Número de brotes promedio en explantes de banano cv. ‘Gran Enano’, durante cinco subcultivos, posterior a la aplicación de etil metano sulfonato (EMS), buffer pH 7 (B. pH7), azida de sodio (AS), buffer pH 4 (B. pH4) y testigo. Centro de Investigaciones en Granos y Semillas.

```
Response: brotes
      Df  Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
repeticion  5 0.12273 0.02455   1.812    0.1562
tratamiento  4 1.69552 0.42388  31.291 2.371e-08 ***
Residuals  20 0.27093 0.01355
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Anexo 6. Coeficiente de correlación en de variables medidas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M. Corporación bananera Nacional. 2022.

Relación	R*
Severidad-No. de hojas	-0,1689
Severidad-HMJS	0,0055

*R representa el coeficiente de variación de Pearson.

Anexo 7. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE), Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS) evaluadas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M (Grupo A). Corporación bananera Nacional. 2022.

Planta	ABCDE	Número de hojas	HMJS
E9	61,50	5,4	2
E12	68,50	5,6	3
A123	87,50	5,4	3
A62	94,50	5,4	3
B78	94,50	5,2	3
A22	94,50	5,0	4
A94	94,50	6,2	4
E16	94,50	5,0	3
A21	94,50	5,0	3
A119	94,50	5,0	3
A78	101,00	5,4	3
A74	101,50	6,0	3
A96	101,50	5,0	4
A48	101,50	4,0	3
A77	101,50	6,4	4
A28	101,50	4,0	3
A137	106,50	6,0	4
A17	106,50	5,4	3
A29	106,50	5,2	3
E13	106,50	5,0	4
A44	106,50	5,0	4
A53	106,50	5,0	4
A81	106,50	5,0	3

A131	106,50	5,0	3
A35	106,50	4,0	2
A31	106,50	6,4	4
A109	106,50	4,0	4
B72	106,50	5,0	4
A24	108,00	4,4	3
A26	108,00	5,0	3
A85	108,00	6,0	4
A128	113,50	6,0	4
E4	113,50	6,0	3
A14	113,50	6,0	3
A4	113,50	5,0	3
A101	113,50	4,6	2
A34	113,50	4,4	2
A69	113,50	7,6	3
A52	113,50	7,2	4
A93	113,50	5,4	3
A61	113,50	5,4	3
B71	113,50	4,0	3
E11	113,50	4,0	3
E5	115,00	4,0	2
B74	115,00	6,0	4

Anexo 8. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE), Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS) evaluadas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M (Grupo B). Corporación bananera Nacional. 2022.

Planta	ABCDE	Número de hojas	HMJS
A5	120,0	5,4	3
A64	120,0	5,4	3
A121	120,0	5,4	3
E6	120,5	4,4	3
A8	120,5	6,0	4
A89	120,5	5,6	3
A39	120,5	5,4	2
A117	120,5	5,0	4
A57	120,5	6,0	3
A46	125,5	6,0	3
A10	125,5	5,0	3

B73	127,0	6,0	3
A25	127,0	5,0	3
B43	127,0	4,4	3
A7	127,0	6,8	3
A92	127,0	6,4	4
A13	127,0	6,2	3
E7	127,0	6,0	3
A112	127,0	6,0	3
A99	127,0	5,0	3
T3	127,0	4,6	3
A135	132,5	6,0	3
E8	132,5	5,0	2
A34	132,5	4,0	3
A91	134,0	5,2	3
A43	134,0	5,0	3
A103	134,0	5,0	3
E1	134,0	4,2	3
A71	134,0	7,0	3
A80	134,0	6,6	4
A87	134,0	6,6	4
A108	134,0	6,4	4
B41	134,0	6,0	4
A36	134,0	6,0	3
A3	134,0	5,8	3
A47	134,0	5,6	3
T5	134,0	5,6	3
A139	134,0	5,4	4
AS2	134,0	5,2	3
E14	134,0	5,0	3
A127	134,0	5,0	3
A113	134,0	4,6	2
A122	134,0	4,4	3
A35	134,0	4,4	2
A19	134,0	4,2	3
A73	134,0	4,2	3
A27	134,0	4,0	3
A58	134,0	4,0	3
T1	134,0	4,0	3
A83	134,0	6,6	3
A79	134,0	6,0	4
A88	134,0	6,0	4
A90	134,0	6,0	4
A32	134,0	4,0	2

Anexo 9. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE), Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS) evaluadas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M (Grupo C). Corporación bananera Nacional. 2022.

Planta	ABCDE	Número de hojas	HMJS
A33	139,0	6,0	3
A55	139,0	5,4	3
A70	139,5	5,4	3
A104	146,0	8,4	4
A82	146,0	6,2	4
T4	146,0	5,2	3
A45	146,0	5,0	4
A136	146,0	5,0	4
A114	146,0	4,0	3
A97	146,0	7,2	4
A132	146,0	6,4	3
A107	146,0	6,2	4
A42	146,0	5,6	3
A98	146,0	5,4	3
A124	146,0	5,4	3
A126	146,0	5,4	3
A9	146,0	5,0	3
A140	146,0	5,0	3
A23	146,0	4,8	3
A50	146,0	4,4	3
A138	146,0	6,8	3
A110	147,5	5,0	4
A130	153,0	5,4	4
A16	153,0	5,0	3
A72	153,0	4,4	3
A118	153,0	4,4	2
A120	153,0	4,4	2
A37	153,0	4,2	2
E2	153,0	4,0	3
A30	153,0	4,0	3
A95	153,0	4,0	3
B75	153,0	6,0	4
A18	153,0	6,0	3
A60	153,0	6,0	3

A111	153,0	6,0	3
A11	153,0	5,6	2
A133	153,0	5,4	3
A134	153,0	5,4	3
B77	153,0	5,2	4
A110	153,0	5,2	4
B45	153,0	5,2	3
A1	153,0	5,0	3
E3	153,0	4,8	2
A59	153,0	4,6	3
A6	153,0	4,4	3
A51	153,0	4,4	3
A125	153,0	4,4	2
E10	153,0	4,2	3
A56	153,0	4,2	2
A66	153,0	4,0	4
B42	153,0	4,0	4
A20	153,0	4,0	3
A65	153,0	4,0	3
A84	153,0	4,0	3
A86	153,0	6,2	4
A67	153,0	5,4	4
A75	153,0	5,2	4
A15	153,0	5,0	4
A100	153,0	4,6	3

Anexo 10. Área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad (ABCDE), Número de hojas y Hoja más joven con síntoma (HMJS) evaluadas en plantas banano cv. ‘Gran Enano’, seleccionadas con menor afectación a Sigatoka negra, tras la exposición a inóculo de *Pseudocercospora fijiensis* M (Grupo D). Corporación bananera Nacional. 2022.

Planta	ABCDE	Número de hojas	HMJS
A68	159,50	6,0	4
A102	159,50	5,0	3
A106	159,50	5,0	3
A116	166,50	6,4	4
A63	166,50	7,2	4
A105	166,50	6,4	4
B76	166,50	6,0	4
A41	166,50	5,2	3
A38	166,50	5,0	3

A40	166,50	5,0	3
T6	166,50	5,0	3
A12	166,50	5,0	2
E15	166,50	4,6	3
A115	166,50	4,4	3
A129	166,50	4,4	3
B44	166,50	4,4	3
A54	166,50	4,0	3
T2	166,50	4,0	3
A76	166,50	6,4	4

Anexo 11. Plantas banano cv. ‘Gran Enano’, tratadas con Etil metano sulfonato o Azida de sodio, en condiciones de invernadero, tras cinco subcultivos, que presentan variaciones clorofilicas. Corporación bananera Nacional. 2022.



Anexo 12. Plantas banano cv. ‘Gran Enano’, tratadas con Etil metano sulfonato o Azida de sodio, en condiciones de invernadero, tras cinco subcultivos, que presentan variaciones morfológicas. Corporación bananera Nacional. 2022.



