



Artículo

## Evaluación de antibióticos y fungicidas, en la introducción *in vitro* de banano (*Musa acuminata*) en la Estación Experimental Sapecho

### Evaluation of antibiotics and fungicides in the *in vitro* introduction of banana (*Musa acuminata*) at the Sapecho Experimental Station

Marco Antonio Echenique Quezada, Wilfredo Huanca Cardozo

**RESUMEN:**

La descontaminación de los explantes es un requisito para la eficiencia de introducción y establecimiento de los explantes *in vitro* de banano (*Musa acuminata*). El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Sapecho, situada en el municipio de Palos Blancos del departamento de La Paz, con el objetivo de evaluar la eficiencia de tres antibióticos y tres fungicidas, en la introducción y establecimiento del cultivo de banano (*Musa acuminata*) variedad Grand Nain. Los antibióticos utilizados fueron Eritromicina, Tetraciclina y Cloranfenicol, mientras que los fungicidas utilizados fueron, Benlate, Ridomil y Cuprocol en diferentes dosis. Los tres antibióticos se adicionaron al medio de cultivo de introducción, mientras que los fungicidas se aplicaron por sumersión de los explantes antes de la siembra en el medio de cultivo, para el análisis de los datos se utilizó un Diseño Completamente al azar (DCA), con nueve tratamientos y tres repeticiones. Para la comparación de medias se aplicó la prueba de Fisher al 5% de probabilidad. Las variables evaluadas fueron: Contaminación total y Sobrevivencia de los explantes. Después de 45 días de cultivo *in vitro*, hubo efectos altamente significativos en la contaminación fúngica (media 33,3%) y la contaminación bacteriana (48,1%). En la variable sobrevivencia (media 46%) se presentaron diferencias significativas en la interacción de fungicidas x antibióticos. El uso del antibiótico Eritromicina en combinación con el fungicida Cuprocol en la introducción y establecimiento de banano, permite reducir las pérdidas por contaminación bacteriana y fúngica, además que, de acuerdo a los resultados observados, los tratamientos T1 y T4 presentaron el mayor porcentaje de contaminación (77,8%), además que el tratamiento que tuvo mayor porcentaje de sobrevivencia fue el T6 (100%).

**PALABRAS CLAVE:**

Banano, Antibióticos, Fungicidas, Establecimiento, *in vitro*.

**ABSTRACT:**

Decontamination of explants is a requirement for the efficiency of introduction and establishment of *in vitro* banana (*Musa acuminata*) explants. The work was carried out at the Plant Biotechnology Laboratory of the Sapecho Experimental Station, located in the municipality of Palos Blancos in the department of La Paz, with the objective of evaluating the efficiency of three antibiotics and three fungicides in the introduction and establishment of the banana (*Musa acuminata*) Grand Nain variety. The antibiotics used were Erythromycin, Tetracycline and Chloramphenicol, while the fungicides used were Benlate, Ridomil and Cuprocol in different doses. The three antibiotics were added to the introduction culture medium, while the fungicides were applied by submerging the explants before planting in the culture medium. For data analysis, a completely randomized design (CRD) was used, with nine treatments and three replicates. For the comparison of means, Fisher's test was applied at 5% probability. The variables evaluated were: total contamination and explant survival. After 45 days of *in vitro* culture, there were highly significant effects on fungal contamination (mean 33.3%) and bacterial contamination (48.1%). In the survival variable (mean 46%), there were significant differences in the fungicide x antibiotic interaction. The use of the antibiotic Erythromycin in combination with the fungicide Cuprocol in the introduction and establishment of banana allows the reduction of losses due to bacterial and fungal contamination. In addition, according to the results observed, treatments T1 and T4 presented the highest percentage of contamination (77.8%), and the treatment with the highest percentage of survival was T6 (100%).

**KEYWORDS:**

Banana, Antibiotics, Fungicides, Establishment, *in vitro*.

**AUTORES:**

**Marco Antonio Echenique Quezada:** Docente Investigador, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz - Bolivia. manmaeq@gmail.com.

**Wilfredo Huanca Cardozo:** Carrera de Ingeniería Agronomica, Facultad de Agronomía - UMSA, La Paz – Bolivia. Huanca477@mail.com

DOI: <https://doi.org/10.53287/pukn2928cx61e>

Recibido: 08/10/2022. Aprobado: 22/11/2022.



## INTRODUCCIÓN

El banano representa uno de los cultivos más importantes en el mundo entero. Más de 400 millones de personas de las zonas tropicales y subtropicales de los países en vía desarrollo depende de la producción de este cultivo, siendo una fruta originaria del sureste del continente asiático e Indochina (FAOSTAT, 2016) y es en esta región donde se lo domestico, mas no se conoce con precisión cuando comenzó la siembra comercial de banano en América, sin embargo, existe evidencia de que ocurrió en Jamaica y Panamá, antes de 1866. es de gran importancia alimentaria y económica a nivel mundial (Soto, 1990).

El banano es uno de los cultivos más importantes y sin embargo, menos estudiadas a nivel mundial, es el alimento básico de millones de personas en los países tropicales en vías de desarrollo y una importante fuente de ingresos para los mercados locales e internacionales (Frison y Shorrock, 2000).

En Bolivia, el área cultivada se estima en 20010 hectáreas de banano, con una producción aproximada de 301.162 t, datos preliminares al 2020 (INE, 2021), que se cultivan en la zona oriental, en Chapare de Cochabamba, en los Yungas Caranavi y Alto Beni de La Paz (Soto A., 2010).

El banano es una fruta de importancia económica en el departamento de La Paz, y las variedades más difundidas de este cultivo son: el guayaquil, el gran enano cavendish (huataco), el guineo y la seda guayaquil (Loayza, 2002).

La zona de Alto Beni se caracteriza por su excelente producción de banano, pero esta producción disminuye año tras año (el peso promedio de un racimo alcanza los 20 kilos en la primera cosecha, 5 años después éste llega apenas a 13 kilos (Loayza, 2002).

La mejora genética de los productos agrícolas, lo que ahora llamamos la "biotecnología", no es nada nuevo, es posible que sea una de las actividades más antiguas del ser humano. En Bolivia el desarrollo de esta disciplina ha mostrado importantes avances, los mismos agrupan diferentes áreas en donde se aplican técnicas biotecnológicas,

como es el caso de salud, industrial, animal y vegetal, es un desafío que permite mostrar el crecimiento que cada una de ellas ha tenido y su contribución significativa al desarrollo del país (FAO, 2009).

La micropropagación in vitro es una técnica que permite la reproducción masiva de plantas libres de organismo fitopatógenos y se constituye en una herramienta para el mejoramiento genético (Roux *et al.*, 2002).

La introducción de material a condiciones in vitro depende de muchos factores entre ellas la desinfección y los productos que se utiliza para este procedimiento, manipulación del material y el medio de cultivo adecuado para el establecimiento (Sandoval *et al.*, 1991). Sin embargo, en la etapa de establecimiento de cultivo in vitro, es frecuente la presencia de microorganismos que provocan la muerte de los explantes introducidos, oxidación fenólica de los tejidos, entre otros, por lo que se hace necesario la realización de pretratamientos en las plantas para disminuir la contaminación y mejorar el establecimiento de los explantes (Ramírez *et al.*, 2008).

Entre los contaminantes microbianos, las bacterias y hongos causan pérdidas elevadas en el cultivo in vitro de plantas (Leifert y Waites, 1992). El uso de antibióticos y fungicidas incorporados al medio de cultivo es una de las alternativas para disminuirlas sobre el material vegetal (Robert *et al.*, 2006; Fang y Hsu, 2012; Mbah y Wakil, 2012; Sabale *et al.*, 2015).

La contaminación microbiana puede ocurrir debido a una desinfección ineficiente o inadecuada del material vegetal, los materiales utilizados y/o el medio de cultivo. Sin embargo, cuando la aparición de estos microorganismos no es el resultado de estos errores, esta contaminación se denomina endógena (Esposito-Polesi *et al.*, 2017).

Los fungicidas constituyen una herramienta valiosa en un programa de manejo de los cultivos, aplicados en los esquejes antes de la siembra de los explantes (Yossen *et al.*, 2010).

Dada la importancia que el banano tiene y que no existen muchos estudios en Bolivia en cuanto a la producción de plantas *in vitro* y a los agentes de

control de microorganismos que provocan contaminación en condiciones de laboratorio producidas por bacteria y hongos fitopatógenos, se considera apropiado generar dicha información. Con base en la problemática antes descrita, se planteó como objetivo evaluar el efecto del uso del antibióticos y fungicidas en el control *in vitro* de bacterias endógenas en yemas apicales de banano (*Musa acuminata* AAA) var. Gran naine.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

La investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Sapecho, dependiente de la Facultad de Agronomía – UMSA, , ubicado a 2 km de la localidad de Sapecho a una distancia de 276 km de la ciudad de La Paz, Provincia Sud Yungas, municipio de Palos Blancos, altitud de 430 m.s.n.m., latitud Sur 15° 33' 27.59", longitud Oeste 67° 20' 05.10", con temperaturas media anual de 28°C y una precipitación anual promedio de 1800 mm (PDM Palos Blancos, 2012).

### Metodología

**Material biológico.** Se utilizaron hijuelos de banano como material biológico de aproximadamente 20 cm de largo recolectados de la Estación Experimental Sapecho de la Facultad de Agronomía - UMSA.

**Recolección del material vegetal de campo.** La planta seleccionada fue de tamaño mediano, con buena calidad de racimo y aparentemente sanas (libres de enfermedades), se consideró la muestra, se escogió a los hijos espada de 20-30 cm con un pedicelo (o pedículo) de 5 a 10 cm de diámetro. La muestra tuvo un meristemo viable. Todos los hijuelos (cormos) seleccionados fueron extraídos e identificados

**Cultivo in vitro de banano (*Musa acuminata*) en la fase de establecimiento.** Para evaluar los bactericidas y fungicidas en la fase de establecimiento para la propagación in vitro del banano se siguieron los siguientes pasos: a) preparación de los medios de cultivo, b) desinfección

del material vegetal y c) establecimiento del cultivo de banano.

**Medios de cultivo.** El medio de cultivo sólido que se utilizó se describe en la Tabla 1. Estos se distribuyeron a 10 ml en cada envase de vidrio (75 mm de largo x 45 mm de diámetro). Posteriormente se procedió a su esterilización en autoclave durante 15 min a 15 PSI de presión y 121 °C.

Tabla 1. Medios de cultivo (Medina *et al.* 2015) para la introducción de yemas apicales de banano (*Musa acuminata*) en la fase de establecimiento *in vitro*.

Elementos	Cantidad
Murashige and Skoog	100%
ANA	0,5 mg L <sup>-1</sup>
IBA	0,5 mg L <sup>-1</sup>
BAP	0,5 mg L <sup>-1</sup>
Tiamina	4 mg L <sup>-1</sup>
Carbón Activado	1 g L <sup>-1</sup>
Sacarosa	30 g L <sup>-1</sup>
Agar	5 g L <sup>-1</sup>

**Desinfección del material vegetal.** Se utilizaron cormos de tamaño de 10 cm, cortadas de forma cuadrada, se procedió al lavado de los cormos con agua y detergente, se desinfectaron en alcohol al 70% durante 5 minutos para luego colocarlos en hipoclorito de sodio (NaClO) al 5, 5% durante 15 minutos. (Ortega *et al.*, 2011) para todos los tratamientos.

#### a) Preparación y adición de bactericidas

Se procedió a preparar los antibióticos pesando la Tetraciclina y Eritromicina en una relación de 500 mg L<sup>-1</sup>. y el cloranfenicol en una relación de 1 ml L<sup>-1</sup> de medio de cultivo.

En la cámara de flujo laminar se colocaron los antibióticos en los medios de cultivo previamente esterilizados en los matraces Erlenmeyer, una vez que este medio de cultivo se encuentre a temperatura de 37°C se adicionó los antibióticos para cada tratamiento removiendo constantemente para obtener una mezcla homogénea, con la ayuda de una pipeta colocamos (dispensamos) en los recipientes de vidrio el medio de cultivo sellándolos con papel aluminio para su posterior utilización.

## b) Preparación de los fungicidas

Los fungicidas se prepararon en 3 vasos de precipitados, para esto se procedió al pesaje de los fungicidas Ridomil y Cuprofol en un peso de 5 g L<sup>-1</sup> y medir el fungicida Benlate a 2 ml L<sup>-1</sup> para luego disolverlos en agua destilada estéril y llevarlos a la cámara de flujo laminar sumergiendo los explantes 30 segundos en los diferentes fungicidas según los tratamientos, para luego sembrar las yemas de banano en los medios de cultivo.

**Establecimiento.** Dentro la cámara de flujo laminar, los hijuelos fueron reducidos a un tamaño de 3 cm y se dejó en hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% durante 10 min, luego se procedió a realizar tres enjuagues en agua destilada estéril posteriormente se redujeron a 1 cm y fueron depositados en solución de ácido cítrico 100 mg L<sup>-1</sup>, por 10 s (Ortega *et al.*, 2011).

La siembra de los explantes se realizó bajo condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar y con la ayuda de pinzas y bisturí estériles. Se colocó los explantes en los frascos de vidrio con medio de cultivo previamente esterilizado.

Pará el establecimiento, se dejó en cuarentena (5 días), con ausencia de luz total para reducir el proceso de oxidación. Una vez cicatrizadas las heridas se evaluó el porcentaje de contaminación de hongos y bacterias, el mismo fue evaluado mediante observación directa, cada cinco días durante 45 días, evaluando la presencia de contaminantes causado por hongos en base a la identificación visual del micelio generalmente saliendo del meristemo del explante y de la presencia de bacterias que se identificaron por su apariencia lechosa y su color blanquecino y amarillo/anaranjado las cuales se manifestaron

dentro del medio de cultivo o alrededor el explante en contacto con el medio de cultivo (Ancasi *et al.*, 2016).

La investigación fue realizada bajo un diseño experimental completamente aleatorio (DCA) con arreglo bifactorial de 3x3 (3 tipos de bactericidas por 3 tipos de fungicidas) con nueve tratamientos y tres repeticiones. Los tratamientos fueron los siguientes:

Tabla 2. Tratamientos con sus respectivos factores.

Tratamiento	Bactericidas x Fungicidas
T1	Tetraciclina x Ridomil
T2	Tetraciclina x Benlate
T3	Tetraciclina x Cuprocol
T4	Eritromicina x Ridomil
T5	Eritromicina x Benlate
T6	Eritromicina x Cuprocol
T7	Cloranfenicol x Ridomil
T8	Cloranfenicol x Benlate
T9	Cloranfenicol x Cuprocol

**Análisis estadístico.** Se realizaron análisis de varianza de un grado de libertad previa verificación de normalidad y homogeneidad de las variables. Las comparaciones de medias fueron realizadas a una P<0.05 de probabilidad, mediante la prueba de Fisher (InfoStat v.11).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Porcentaje de contaminación total

El análisis de varianza del porcentaje de contaminación, muestra que existe diferencias altamente significativas entre los tres tipos de antibióticos utilizados, tres tipos de fungicidas y la interacción de las mismas, obteniendo un coeficiente de variación de 3,05%, lo cual indica que los datos obtenidos en la investigación fueron llevados correctamente.

Tabla 3. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación total.

F.V.	SC	gl	CM	F cal.	Probabilidad	Significancia
Tipo de Antibiotico (A)	0,06257	2	0,03128	11,63116	0,00057	**
Tipo de Fungicida (B)	0,11477	2	0,05738	21,33529	0,00002	**
(A x B)	0,14335	4	0,03584	13,32467	0,00003	**
Error	0,04841	18	0,00269			
Total	0,36909	26				

C.V. = 3,05%; \*\* = Altamente Significativo; \* = Significativo; NS = No Significativo.

Realizada la prueba de Fisher se obtuvo que existen diferencias altamente significativas entre los

antibióticos, entre los fungicidas utilizados y la interacción de ambos productos, el antibiótico más

efectivo que obtuvo 0% de contaminación fue la Eritromicina, seguido de los tratamientos donde se

utilizó Tetraciclina y finalmente los tratamientos que utilizamos Cloranfenicol (Figura 1).

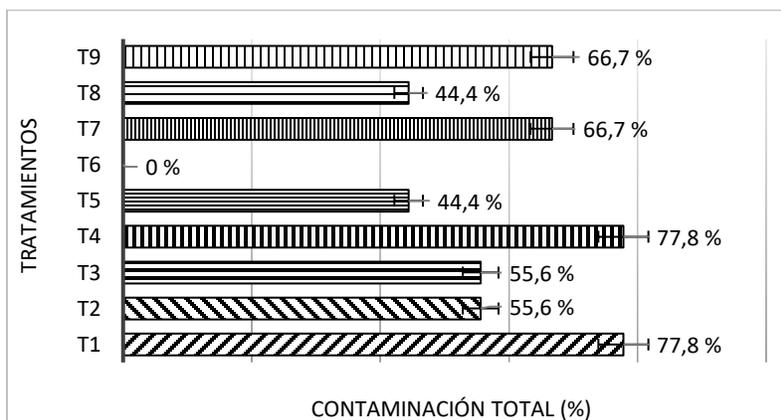


Figura 1. Porcentaje de contaminación total en la fase de establecimiento in vitro de banano

La presencia de agentes contaminantes ya sean bacterias u hongos en los cultivos in vitro se debe a varios factores, entre los que sobresalen la asociación del explante a su medio, las condiciones de la introducción y la fuente origen del material vegetal; de ahí la importancia de obtener un material vegetal adecuado para usarlo como explante (Mroginski, Roca, 1991).

Recalde y Bastidas (2007), indican que la contaminación, más que matar a los explantes directamente, invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para su micropropagación. Kumar *et al.* (2007) indica que los fungicidas cúpricos como el oxiclورو de cobre (Cuprocol), por su mecanismo de acción multisitio no específico poseen bajo riesgo para el desarrollo de resistencia.

Brandao (2011) en trabajos realizados indica que el uso de fungicida derosal (5 mL L<sup>-1</sup>) asociado a los antibióticos cloranfenicol (500 mg L<sup>-1</sup>) y ampicilina (500 mg L<sup>-1</sup>), provocaron en promedio hasta un 86% de explantes contaminados por hongos. Galón (2017), obtuvo un alto promedio de contaminación al someter explantes a inmersión en cloranfenicol (10 µL), indicando también la

ineficiencia de este método en el control de bacterias endógenas.

Santana (2011), indica que la efectividad de los antibióticos presenta diferentes resultados, estos pueden explicarse por el hecho de que cada antibiótico genera un tipo de defensa, que depende de la composición química y la forma en que actúan sobre la bacteria. Lattuada (2010), menciona que la inmersión de explantes en una solución que contenga 200 mg L<sup>-1</sup> del antibiótico tetraciclina, promueve la ausencia de contaminación bacteriana y fúngica.

### Porcentaje de sobrevivencia

Realizado el análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia, señala que no existe diferencia significativa entre los tipos de antibióticos utilizados, pero si existe diferencias altamente significativas entre los tipos de fungicidas y se presenta una diferencia significativa en la interacción de ambos productos, para la introducción de banano a condiciones in vitro en la fase de establecimiento, obteniendo un coeficiente de variación de 4,97%, lo cual indica que los datos obtenidos en la investigación fueron llevados correctamente.

Tabla 4. Análisis de varianza para el porcentaje de sobrevivencia.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Columna7
Tipo de Antibiotico (A)	0,03917	2	0,01958	2,89087	0,081519	NS
Tipo de Fungicida (B)	0,13439	2	0,06719	9,91762	0,001248	**
(A x B)	0,08011	4	0,02002	2,95605	0,048536	*
Error	0,12195	18	0,00677			
Total	0,37563	26				

C.V. = 4,97 %; \*\* = Altamente Significativo; \* = Significativo; NS = No Significativo.

A través de la prueba de Fisher se identificó promedios altos de sobrevivencia de los explantes en el tratamiento 6 con 0% de contaminación, también en los tratamientos T8 y T5 con 44 % de

contaminación y finalmente los tratamientos T1 y T4 donde se presentaron mayor contaminación 77,8 % (Figura 2).

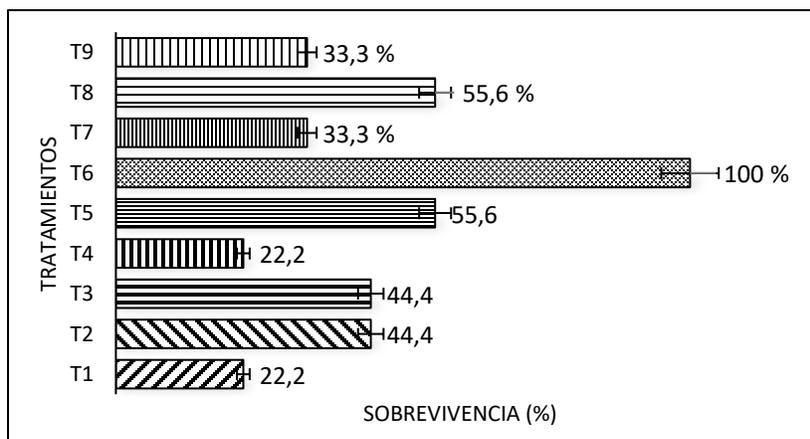


Figura 2. Porcentaje de sobrevivencia en la fase de establecimiento *in vitro* de banano (*Musa acuminata*).

Niubó *et al.*, (2004), mencionan que con el cultivo *in vitro* se obtienen cultivos asépticos que favorecen su propagación. Pero si se tiene en cuenta que los tejidos de los cuales se parte para iniciar el cultivo provienen del campo entonces, la probabilidad de la contaminación por virus, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, es elevada.

Sabale *et al.* (2015) con la incorporación al medio de cultivo de cefotaxima 1000 mg l-1 alcanzaron un control efectivo de la contaminación bacteriana en la micropropagación de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) sin fitotoxicidad.

Los resultados de diferentes estudios demostraron que el empleo de métodos de desinfección superficial del material vegetal procedente de plantaciones establecidas, no garantiza la eliminación de los contaminantes bacterianos y fúngicos asociadas a plantas y como contaminantes de diferentes cultivos propagados *in vitro* (Leifert y Waites, 1992; Reed et al, 1995; Asif *et al.*, 2013).

A pesar de esto, existen pocos informes de estudios que confirmen el uso aislado de antibióticos para reducir la contaminación fúngica, por lo que se recomienda realizar experimentos evaluando diferentes tipos de antibióticos y fungidas para cada especie, con el fin de obtener la máxima

eficiencia de descontaminación y alta supervivencia de los explantes.

### CONCLUSIONES

Con respecto a la contaminación tanto por hongos, bacterias y oxidación, en la fase de establecimiento del cultivo son las principales causas de pérdida de material vegetal, por lo que se debe utilizar algunos productos para la desinfección de los explantes, además de realizar una buena desinfección superficial.

El uso del antibiótico Eritromicina en combinación con el fungida Cuprocol en la introducción y establecimiento de banano, permite reducir las pérdidas por contaminación bacteriana y fúngica.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el trabajo, también se pueden utilizar el Benlate (fungida) y la tetraciclina (antibiótico) para la fase de introducción y establecimiento de banano a condiciones *in vitro*.

La efectividad de estos productos (antibióticos y fungidas), dependen de la concentración utilizada y la forma de aplicación que puede ser en el medio de cultivo, como también de forma externa en forma de sumersión en los productos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ancasi, R; Montero, J; Ferreira, N; Muñoz, I. 2016. Determinación un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca* L). Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. All rights reserved. Vol 7 N° 2. ISSN 2072.9308 (online edition).
- Asif M, Eudes F, Randhawa H, Amundsen E, Yanke J, Spaner D; 2013. Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. Plant Cell Rep 32(10):1637-1646; doi: 10.1007/s00299-013-1476-4
- Brandao, HLM; 2011. Propagación in vitro de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), breu branco (*Protium spruceanum* Benth.), copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) y palo de rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). (Tesis de Doctorado en Biotecnología). Manaus, Universidad Federal de Amazonas. 59 págs.
- Esposito-Polesi, NP, de Abreu-Tarazi, MF, de Almeida, CV, Tsai, SM & de Almeida, M.; 2017. Investigación de la comunidad bacteriana endofítica en cultivos supuestamente axénicos de piña y orquídeas con evidencia de abundantes bacterias intracelulares. Microbiología actual, 74 (1), 103-113.
- Fang JY, Hsu YR; 2012. Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micro propagated *Aglaonema* cultures. Plant Cell Tiss Org Cult 110:53–62; doi: 10.1007/s11240-012-0129-6
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Databases (FAO).
- Frison, E; Sharrok, S. 2000. Biodiversidad y producción sostenible del banano Red Internacional para la Mejora del Banano y del Plátano (en línea). Cuba Consultado 13 de mayo 2004 Disponible en <http://www.BanaFair.De/publ/report/spa/s.htm>.
- Galón, FI. 2017. Desinfección de segmentos nodales de *Eugenia involucrata* dc. a través de nanopartículas de oro y plata para la propagación in vitro. (Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas). São Gabriel, Universidad Federal de la Pampa. 60 pág.
- INE (Instituto Nacional de Estadística). 2021. Estadísticas económicos agropecuario. Consultado el 29 de octubre de 2021 en :<https://www.ine.gov.bo/index.php/estadisticas-economicas/agropecuaria/agricultura-cuadros-estadisticos/>
- Kumar A, Reddy N, Reddy K, Devi M. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri export zone of Andhra Pradesh, India. Plant Pathology Bulletin 16:157-160.
- Leifert C, Waites WM. 1992. Bacterial growth in plant tissue culture media. Journal of Applied Bacteriology 72: 460-466
- Loayza A; 2002. Investigación de mercado para la comercialización de Banano Orgánico en la Ciudad de La Paz. VIMDESALT Proyecto Banano Orgánico. La Paz, Bolivia
- Mbah EI, Wakil SM. 2012. Elimination of bacteria from in vitro yam tissue cultures using antibiotics. J Plant Pathol 94:53–58
- Niubó E, Díaz P, Oliva O, Portieles R, Díaz A, Ancheta O, Rodríguez S, Soto A, Sánchez C. 2004. Metodología para la obtención in vitro de plantas y tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. Revista CENIC Ciencias Biológicas 35 (3): 55-161
- Ortega, N; Korvena, S; Ruiz, O; Santos, E; Peralta, E. 2011. Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de Banano y Platano *Musa acuminata* a partir de “Meristemas apicales” y “Scalps”. Revista Tecnológica ESPOL, Vol. 23, N° 1 Guayaquil (Ecuador). p. 4.
- PDM (Plan de Desarrollo Municipal). 2012. PDM, Desarrollo Productivo, Municipio de Palos Blancos. La Paz, Bolivia.
- Reed BM, Buckley PM, Dewilde TN. 1995. Detection and eradication of endophytic bacteria from micro propagated mint plants. In Vitro Cell Dev Biol- Plant 31:53–57
- Recalde, C; Bastidas, A. 2007. Establecimiento del cultivo in vitro y aclimatación en invernadero de nepeta hederácea variegata [tesis licenciatura]. Universidad Politécnica Militar. Ecuador. p. 92.
- Robert ML, Herrera-Herrera JL, Castillo E, Ojeda G, Herrera-Alamillo MA. 2006. An Efficient Method for the Micropropagation of Agave

- Species. En: LoyolaVargas VM, Vázquez-Flota F (eds). *Methods in Molecular Biology*, pp. 165-178. Humana Press, New Jersey; doi: 10.1385/1-59259-959-1:165
- Roux N, Toloza A, Busogoro JP, Panis B, Srosse H, Lepoivre P. 2002. Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. In: Jacome, L.; P. Lepoivre.; D. Marin; R. Ortiz.; R. Romero and J. Escalant (EDS). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San José, Costa Rica. p. 239-50.
- Sabale SN, Patil DM, Gokhale NB, Sawardekar SV, Sawant SS. 2015. Elimination of bacterial contamination by using antibiotics in micropropagation of banana (*Musa* spp.) cv. Grand naine *Journal of Cell and Tissue Research* 15(2): 5111-5115
- Sandoval, J; Brenes, G; Pérez Sánchez, L. 1991. Micropropagación de Plátano y Banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE. Serie técnica, Informe técnico CATIE N° 186. Turrialba (Costa Rica). p. 2.
- Santana, VC. 2006. El papel de los antibióticos en la resistencia bacteriana. *Revista Cesumar*, 11 (1), 129-138.
- Soto. A.1990. "Bananos: Cultivo y Comercialización". Asociación Bananera nacional. San José. Costa Rica. p 627.