

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE CALCIO, COBRE Y
BORO EN EL DESARROLLO DE PLANTAS
MICROPROPAGADAS DE BANANO VARIEDAD WILLIAMS, E
INOCULADAS CON CONIDIAS Y CONCENTRADO CRUDO
TÓXICO DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

MASTER EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presentado por:

BARCOS ARIAS MILTON SENEN

GUAYAQUIL - ECUADOR

AÑO

2009

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida que me ha dado y por todo lo que he recibido en ella.

A mis padres por darme la vida, por mi formación como persona y como profesional y por siempre apoyarme en mis necesidades y en mis sueños.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y por todo lo que significa en mi vida profesional.

A la Dra. Esther Lilia Peralta, director de tesis por su fundamental apoyo, académico, científico, profesional y personal, durante la ejecución y escritura de la tesis.

A la Dra. María Isabel Jiménez por su apoyo y orientación para la concretización de mi trabajo de tesis.

Al MSc. Omar Ruiz Barzola y a su ayudante Patricia Gómez por el apoyo en el planeamiento de la tesis y por su invaluable orientación en los análisis estadísticos, además por sus consejos durante la redacción de la tesis.

Al Ing. Alberto Ortega Urrutia, fundador del programa de Maestría en Biotecnología Agrícola por sus enseñanzas durante mis estudios de Maestría.

A la Dra. Helga Rodríguez por su orientación y apoyo en la redacción de la propuesta de tesis.

A la MBA. Ana Armijos por su constante apoyo moral para que culmine con éxitos la tesis.

Y a todos mis compañeros del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador que de una u otra manera han contribuido al desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi Dios Jehová, a mis
padres y hermanos, a mi
esposa, y en especial al Dr.
Rodolfo Maribona Hernández
(+).

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

**Ing. Francisco Andrade S.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE**

**Esther Lilia Peralta García Ph.D
DIRECTOR DE TESIS**

**María Isabel Jiménez Ph.D
VOCAL**

**Omar Ruiz Barzola M.Sc
VOCAL**

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

MILTON BARCOS ARIAS

Resumen

Esta investigación contribuye a la búsqueda de estrategias para el manejo de la Sigatoka negra en banano. Sus objetivos estuvieron dirigidos a determinar la influencia de calcio, cobre y boro sobre los parámetros de crecimiento, a nivel in vitro, de plantas de banano variedad Williams y su comportamiento en el desarrollo de la Sigatoka negra. Para el estudio se diseñaron ocho tratamientos con diferentes combinaciones y concentraciones de los tres elementos y se empleó un testigo, constituido por el medio MS comercial. Una vez sembrados los propagulos, se evaluó semanalmente, durante 45 días, los parámetros agronómicos: altura de planta, número de hojas, número de raíces y longitud de la raíz principal, a excepción del largo y ancho de hoja que se evaluó al finalizar esta parte del ensayo. Posteriormente, se tomaron discos de hojas de las vitroplántulas y se realizaron inoculaciones dirigidas con suspensiones conidiales (25µl por cada muestra a una concentración de 3000conidias/ml y con concentrado crudo tóxico de *M. fijiensis* (2µl por cada muestra), evaluándose los daños de acuerdo a lo establecido en cada ensayo. El análisis estadístico de los datos obtenidos permitió determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos y el control al evaluarse los diferentes parámetros estudiados, observándose una mayor significancia entre tratamientos y control al evaluarse el parámetro largo de la raíz principal. Las evaluaciones realizadas con conidias no presentaron

diferencias estadísticas a pesar de que los tratamientos T3 (Ca₁B₁), T4 (Ca₂B₂), T5 (Cu₁+B₁), T6 (Cu₂+B₂), T7 (Ca₁+Cu₁+B₁) y T8 (Ca₂+Cu₂+B₂) presentaron menor grado de infección. En las muestras inoculadas con concentrado crudo tóxico se reflejaron diferencias estadísticas entre los tratamientos y el control. Se pudo evidenciar un menor grado de infección en las muestras tratadas con la combinación de los tres elementos a mayor concentración del tejido foliar.

Palabras claves: Medio MS, *In-vitro*, concentrado crudo tóxico, conidias, *Sigatoka* negra.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 EI CULTIVO DE BANANO.....	5
2.1.1 Origen y Distribución.....	5
2.1.2 Importancia Económica.....	6

2.1.3 Principales plagas del cultivo de banano.....	7
2.2 LA SIGATOKA NEGRA.....	10
2.2.1 Origen y distribución de la Sigatoca negra.....	10
2.2.2 Importancia Económica.....	11
2.2.3 Etiología.....	12
2.2.4 Síntomas de la enfermedad.....	13
2.2.5 Metabolitos secundarios de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	14
2.2.6 Selección <i>in-vitro</i> usando toxinas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	15
2.2.7 Manejo de la enfermedad.....	18
2.3 LA NUTRICIÓN MINERAL.....	21
2.3.1 Funciones del calcio, cobre y boro en las plantas.....	22
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Efecto de las diferentes concentraciones de calcio cobre y boro sobre parámetros de crecimiento de vitroplántulas de banano de la variedad Williams.....	37
3.2 Efecto de las diferentes concentraciones de calcio, cobre y boro sobre el desarrollo de la infección de la Sigatoka negra.....	44

3.3 Efecto de las diferentes concentraciones de calcio, cobre y boro sobre las lesiones ocasionadas por el concentrado crudo tóxico de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	51
4 RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	57
4.1 Efecto de las diferentes concentraciones de calcio, cobre y boro sobre parámetros de crecimiento.....	57
4.1.1 Efecto del calcio, cobre y boro sobre el parámetro altura.....	57
4.1.2 Efecto del calcio, cobre y boro sobre el número de hojas.....	59
4.1.3 Efecto del calcio, cobre y boro sobre el largo de hoja.....	60
4.1.4 Efecto del calcio, cobre y boro sobre el ancho de hoja.....	61
4.1.5 Efecto del calcio, cobre y boro sobre el número de raíces.....	63
4.1.6 Efecto del calcio, cobre y boro sobre el largo de raíz.....	64
4.2 Efecto de las diferentes concentraciones de calcio, cobre y boro sobre el desarrollo de la infección de la Sigatoka negra	67
4.3 Efecto de las diferentes concentraciones de calcio, cobre y boro sobre las lesiones ocasionadas por el concentrado crudo tóxico de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	69
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	76

6. BIBLIOGRAFÍA

7. APÉNDICE

ABREVIATURAS

ABA	Acido Abscísico
B	Boro
Ca	Calcio
Cu	Cobre
°C	Grados centígrados
pH	Indicador del nivel de acidez o alcalinidad
V8	Medio de cultivo a base de tomate
PDV8	Medio de cultivo a base de papa dextrosa y V8
µm	Micrómetro
µl	Microlitros
mmHg	Milímetros de mercurio
mg	Miligramos
MS	<i>Murashige y Skoog</i>
<i>M. fijiensis.</i>	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
Nm	Nanomicras
PDA	Papa Dextrosa Agar
RG-II	Ramnogalacturonano II
rpm	Revoluciones por minutos
Spp.	Varias especies

SIMBOLOGÍA

ε_{ij}	Error de estimación de la j-ésima observación en el i-ésimo tratamiento
τ_i	i-ésimo tratamiento aplicado en el diseño
i	Número de tratamientos
j	Número de observaciones por tratamiento
U	Promedio de las observaciones
Y	Valores que adquiere la variable observada en el i-ésimo tratamiento, j-ésima observación.
σ^2	Varianza

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Principales plagas del cultivo de banano.....	7
TABLA 2	Relación entre el contenido de calcio del fríjol, la actividad de las enzimas pectolíticas en el tejido vegetal, y la severidad de la enfermedad de la Pudrición Blanda causada por <i>Erwinia Carotovora</i>	26
TABLA 3	Composición química para 250 ml de medio cultivo usado en los nueve tratamientos.....	39
TABLA 4	Modelo del diseño experimental.....	42
TABLA 5	Test de Kruskal Wallis del área bajo la curva de las inoculaciones con conidias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	67
TABLA 6	Test de Kruskal Wallis del área bajo la curva de las inoculaciones con concentrado crudo tóxico de <i>M, fijiensis</i>	70
TABLA 7	Total de componentes principales de las variables estudiadas....	73
TABLA 8	Matriz de componentes principales.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Evolución de los síntomas de la Sigatoka negra.....	14
FIGURA 2	Complejo B-Ramnogalacturonano II.....	33
FIGURA 3	Cámara de crecimiento <i>in-vitro</i> de plántulas.....	38
FIGURA 4	Inoculación con conidias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en tejido foliar <i>in-vitro</i> de banano variedad Williams.....	47
FIGURA 5	Evolución de los síntomas de la Sigatoka negra bajo condiciones de invernadero (foto CIBE-ESPOL).....	49
FIGURA 6	Representación esquemática del proceso utilizado para la obtención del concentrado crudo tóxico de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	53
FIGURA 7	Inoculación con concentrado crudo tóxico de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en tejidos foliar <i>in-vitro</i> de banano variedad Williams....	55
FIGURA 8	Síntomas causados en los tejidos foliares por las inoculaciones con conidias de <i>M. fijiensis</i> . Literal a) síntomas observados a simple vista y literal b) observados al microscopio de luz.....	68
FIGURA 9	Síntomas causados en los tejidos por las inoculaciones con concentrado crudo tóxico de <i>M. fijiensis</i> literal a), síntomas observados a simple vista y literal b), observados al microscopio de luz.....	71

ÍNDICE DE GRAFICOS

GRAFICO 1. Área bajo la curva (ABC) del parámetros altura de planta.....	59
GRAFICO 2. Área bajo la curva (ABC) del parámetros número de hoja.....	61
GRAFICO 3. Parámetro largo de hoja de plantas de banano.....	62
GRAFICO 4. Parámetro ancho de hojas de plantas de banano.....	63
GRAFICO 5. Área bajo la curva (ABC) del total de las raíces.....	65
GRAFICO 6. Área bajo la curva (ABC) de la longitud de la raíz principal.....	66
GRAFICO 7. Índice de severidad para las inoculaciones con conidias de <i>M, fijiensis</i>	69
GRAFICO 8. Mediana ABC para las inoculaciones con concentrado crudo tóxico de <i>M, fijiensis</i>	71

1. INTRODUCCIÓN

El banano es una monocotiledónea del género *Musa spp.* Originaria del sureste de Asia, desde donde se extendió a diferentes partes del mundo como consecuencia de la migración del hombre (36).

El cultivo del banano es uno de los más importantes a nivel mundial, por ser el alimento básico de millones de personas en los países tropicales en vías de desarrollo y constituye una importante fuente de ingreso para los mercados locales e internacionales (22).

En la economía ecuatoriana la producción bananera juega un papel importante ya que representa para el país el segundo rubro en importancia económica después del petróleo. El Ecuador cuenta con un área total cultivada de 169,219 hectáreas que producen un volumen de exportación de 4, 772,413 TM (40).

El cultivo del banano se ve afectado por una serie de patógenos como son hongos, bacterias, virus y nemátodos. La Sigatoka negra es una de las enfermedades más importantes del banano mundialmente; es causada por el

hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet que afecta el área foliar del cultivo, ocasionando elevadas pérdidas. Esta enfermedad constituye el principal problema fitosanitario de la producción en todos los países productores. A pesar de la importancia económica del cultivo y de los esfuerzos que se realizan en diversos centros de investigación, aún no ha sido posible encontrar un control eficaz para la enfermedad.

Tradicionalmente, la principal estrategia de control de problemas fitosanitarios en los cultivos ha sido la química. El banano no es la excepción, y problemas sanitarios como la Sigatoka negra ha incrementado el uso de químicos (12). Por lo tanto, es necesario contribuir con investigaciones que permitan entender mecanismos naturales de resistencia a la enfermedad (56).

Debido a que los nutrientes minerales actúan directa o indirectamente sobre las funciones fisiológicas o forman parte de las estructuras de crecimiento y de reproducción (1), el estudio de la nutrición mineral de elementos como calcio, cobre, y boro es importante para verificar cómo éstos nutrientes ayudan al fortalecimiento de la célula asistiendo como mecanismos de defensa en las plantas. Este es un factor que influye no solo en términos de aumento de la producción, como se analiza frecuentemente, sino que

además interviene en la calidad de los productos y en la tolerancia de la planta al ataque de plagas y enfermedades.

Con estos antecedentes, la hipótesis de trabajo en esta investigación fue la siguiente: “Los elementos calcio, cobre, y boro intervienen en el crecimiento de plantas de banano reproducidas *in-vitro* e inciden en la respuesta a inoculaciones dirigidas de *M. fijiensis*”. Para comprobar esta hipótesis nuestros objetivos de trabajo fueron los siguientes:

Objetivo General:

- Determinar la influencia de los nutrientes calcio, cobre y boro en el desarrollo de plantas de banano de la variedad Williams micropropagadas para inducir resistencia mecánica al ataque de *M. fijiensis* Morelet.

Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de combinaciones y concentraciones de calcio, cobre y boro sobre parámetros de crecimiento, a nivel *in vitro*, de plántulas de banano (Cavendish, variedad Williams).

- Monitorear los síntomas producidos por la inoculación dirigida de estructuras asexuales del *M, fijiensis* sobre tejido foliar de plántulas de banano, variedad Williams, tratadas con combinaciones y concentraciones de calcio, cobre y boro.

- Determinar los daños causados por la inoculación del concentrado crudo tóxico de *M, fijiensis* sobre tejido foliar de plántulas de banano, variedad Williams, tratadas con combinaciones y concentraciones de calcio, cobre y boro.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL CULTIVO DEL BANANO

2.1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCION

El banano se origina en el sudeste de Asia, en las junglas de Malasia, Indonesia, y Filipinas, y está distribuido desde África occidental hasta el Pacífico (57). En Ecuador se encuentra distribuido en el litoral, bajo condiciones agroclimáticas diversas que favorecen la presencia y desarrollo de fitopatógenos que afectan el rendimiento y calidad de la fruta (63).

El banano pertenece al género *Musa* de la familia Musáceas, orden *Gingiberales*. El banano se considera una hierba gigante perenne; no posee tronco y en su lugar presenta vainas foliares que forman una estructura llamada pseudotallo, que puede llegar a medir 30 cm. de diámetro y alcanzar los 7 m. de altura (37).

Como el resto de las monocotiledóneas, posee un sistema de raíces adventicio que se origina del rizoma. El sistema radicular del cultivo de banano es débil. Las hojas son de color verde o amarillo verdoso, sus

bordes lisos y sus nervaduras pinnadas. La planta llega a tener de 10 a 15 hojas funcionales durante la floración y de 5 a 10 durante la cosecha. Las flores están agrupadas en racimos de 10 a 20 y protegidas por brácteas de color púrpura (32).

2.1.2. Importancia Económica

El banano es el cuarto cultivo de mayor importancia a nivel mundial luego del trigo, el arroz y el maíz. Es la fruta de mayor exportación en términos de volumen y la segunda, luego de los cítricos, en términos de valor. La quinta parte de la producción mundial de este cultivo es comercializada internacionalmente.

La industria del banano representa una importante fuente de ingresos y empleo para los principales países exportadores de Latinoamérica, el Caribe, Asia y África. Los cuatro países que lideran las exportaciones son Ecuador, Costa Rica, Filipinas y Colombia, mientras que los mayores productores son India, Brasil, China, Ecuador, Filipinas, Indonesia, Costa Rica, México, Tailandia y Colombia (20).

2.1.3. Principales plagas del cultivo de banano

Las plagas del banano (Tabla 1) representan un factor determinante en términos de producción. Las variedades comerciales más comunes a nivel mundial podrían, en los próximos años, desaparecer debido a la amenaza que diferentes tipos de patógenos representan para el cultivo (21). La Sigatoka negra, sin lugar a dudas, es una de las enfermedades de mayor importancia para el cultivo de banano, razón por la cual se presentará más detalladamente en esta revisión.

TABLA 1.

PRINCIPALES PLAGAS DEL CULTIVO DE BANANO

Tipo de plaga	Agente causal	Principales síntomas
	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet.	Produce daños severos al sistema foliar pudiendo ocasionar la muerte a la planta (60).
	<i>Mycosphaerella musícola</i> Leach.	Produce daños severos al sistema foliar, pudiendo ocasionar la muerte de la planta (51).

Enfermedades fungosas	<i>Fusarium oxysporum</i> f. cubense.	Las hojas eventualmente se agobian y mueren, pero el pseudotallo permanece erecto por uno o dos meses hasta que se pudre y se seca (26).
	<i>Cordana musae.</i>	Produce daños severos al sistema foliar, pudiendo ocasionar la muerte de la planta (36).
Enfermedades bacterianas	<i>Ralstonia solanacearum.</i>	Produce amarillamiento, necrosis y quiebra de la base de las hojas más jóvenes. Ocasiona la muerte de las plantas (26).
	<i>Erwinia</i> o Cogollo negro.	Ocasiona pudriciones en el tallo (26).
Enfermedades ocasionadas por nematodos	<i>Radopholus similis,</i> <i>Helicotylenchus multicinctus</i> y <i>Meloidogyne.</i>	Causan lesiones profundas en las raíces (64).
	<i>Cosmopolites sordidus.</i>	Produce galerías negras en el cormo (26).
	<i>Ceramidia viridis, Sibini apicalis, Caligo teucer</i> y	Producen perforaciones paralelas a las venas foliares,

Insectos	<i>Opsipbanes tamarindo.</i>	disminuyendo la superficie foliar (6).
	<i>Palleucothrips musae</i> y <i>Frankliniella parvula.</i>	Producen manchas de color rojizo en la corteza de los frutos desmejorando notoriamente su aspecto (50).
Enfermedades virales	Virus del cogollo arrepolloado (Banana Bunchy Top Virus, BBTV).	Las plantas presentan una apariencia de roseta con hojas angostas, erectas y progresivamente más cortas. (41).
	Mosaico (ocasionado por el virus del mosaico del pepino, CMV)	Se caracteriza por la presencia de clorosis, mosaico foliar, deformación de hojas, amarillamiento, pudrición del pseudotallo y necrosis de la hoja cigarro (34).
	Virus del rayado del banano (Banana Streak Virus, BSV).	Produce un rayado clorótico en las hojas, que posteriormente se torna necrótico (2).
	Virus del mosaico de las brácteas del banano (Banana Bract Mosaic Virus, BBMV)	Presencia de mosaicos de color café oscuro en las brácteas de la inflorescencia (2).

2.2. LA SIGATOKA NEGRA

2.2.1. Origen y Distribución de la Sigatoka negra.

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Paracercospora fijiensis*) es el agente causal de la enfermedad de la raya negra del banano o Sigatoka negra, como se conoce comúnmente, considerada la enfermedad foliar más limitante en la producción de este cultivo (60). La cronología de la enfermedad destaca diferentes registros alrededor del mundo, aunque se ubica su origen en el Sudeste Asiático, al igual que *M. musicola*, agente causal de la Sigatoka amarilla.

En América Latina, la enfermedad apareció en Honduras en 1972 (45), y desde entonces se ha diseminado progresivamente a otros países del continente y de la cuenca del Caribe. Entre 1973 y 1980 ocurrieron severas epidemias en Honduras, Belice, Guatemala, Nicaragua y Costa Rica. En 1981 apareció en México, Panamá y Colombia, y en 1986 en Ecuador. En la década siguiente se registró en Cuba (1990), Venezuela (1991) Jamaica y República Dominicana (1995-96) y Brasil (1998), (35). En el continente africano se registró por vez primera en Zambia en 1973 y Gabón (1978); posteriormente la

enfermedad se ha diseminado en toda la franja tropical del continente.

2.2.2. Importancia Económica

La acción del agente causal de la Sigatoka negra es capaz de ocasionar severos daños al follaje de la planta, destruyendo su capacidad de respiración y fotosíntesis, reduciendo con ello el rendimiento y calidad de la fruta; si el ataque se produce sobre todo en las hojas jóvenes de la planta, la pérdida de la producción es total. La fruta obtenida de plantaciones atacadas por este mal, se madura rápidamente en el trayecto a los mercados, con las consiguientes pérdidas para los agroexportadores (61). Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad pueden ser devastadoras. Se ha estimado que la necrosis de las hojas puede reducir los rendimientos entre 35 y 50% o inclusive causar la pérdida total de la producción, si no se controla adecuadamente.

Los programas de control de Sigatoka negra basados en la aplicación de fungicidas químicos deben repetirse indefinidamente todos los años a costos cada vez mayores. La medida más sostenible de control es el manejo integrado. Las plantaciones a gran escala pueden

asimilar el costo de la fumigación pero la mayoría de los pequeños productores no, por lo que son más propensos a sufrir pérdidas. Este hecho genera un problema no solamente económico sino también social, ya que las consecuencias de los altos costos se traducen en una reducción de la superficie sembrada, aumentando la tasa de desempleo y la sustitución del rubro (42).

2.2.3. Etiología

El agente causal de la Sigatoka negra tiene la característica de reproducirse de manera sexual y asexual durante su ciclo de vida (18). La fase asexual del hongo se presenta en el desarrollo de las primeras lesiones de la enfermedad, (pizcas y manchas), en las que se ha observado la presencia de un número relativamente bajo de conidiósforos (estructura donde se producen las esporas asexuales o conidias) que salen de los estomas, principalmente en la superficie inferior de la hoja.

Según Douglas, M., & Ronald, R. (1992), la fase sexual es la más importante en el desarrollo de la enfermedad, ya que se produce un gran número de ascosporas, en estructuras denominadas

pseudotecios. Las ascosporas son las esporas sexuales. Aunque tanto las conidias como las ascosporas son las estructuras de diseminación de la enfermedad, las ascosporas se consideran la fuente principal de inóculo y el medio de dispersión a grandes distancias dentro de un área determinada (11).

2.2.4. Síntomas de la enfermedad

Los primeros síntomas de la enfermedad de la Sigatoka negra son manchas cloróticas muy pequeñas que aparecen en la superficie inferior de la tercera o cuarta hoja abierta. El color de las rayas va haciéndose más oscuro, algunas veces con un matiz púrpura, y visible en la superficie superior. Cuando el grado de severidad de la enfermedad es alto, grandes áreas de la hoja pueden ennegrecer como se puede observar en la (Figura 1), (9).

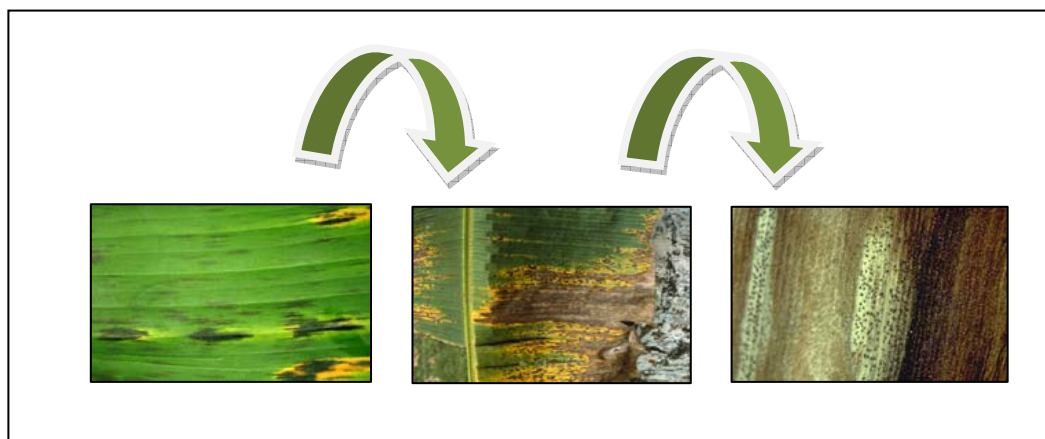


FIGURA 1. EVOLUCIÓN DE LOS SÍNTOMAS DE LA SIGATOKA NEGRA.

(Fuente:<http://www.apsnet.org>)

2.2.5. Metabolitos secundarios de *Mycosphaerella fijiensis*

M. fijiensis también sintetiza un conjunto de metabolitos secundarios como son las fitotoxinas que producen la necrosis del tejido foliar y disminuyen drásticamente la productividad y calidad de los racimos.

Las fitotoxinas producidas por el hongo *M. fijiensis*, constituyen un conjunto de 7 compuestos aromáticos: 1) 2, 4, 8-trihidroxitetralona, 2) la juglona, 3) el ácido 2-carboxi-3-hidroxicinámico, 4) el ácido dimetiléster 2-carboxi-3-hidroxicinámico, 5) el ácido isocracínico, 6) el 4- hidroxiscistalona y 7) la fijiensina, que causan la necrosis de la hoja

en cultivares susceptibles a la enfermedad (27).

La fijiensina, es un metabolito fitotóxico aislado de cultivo líquido de *M. fijiensis*. En el laboratorio algunas pruebas demuestran que es fitotóxico para varios cultivares de plátano. La estructura de la fijiensina fue determinada mediante análisis de rayos X. La producción de fijiensina en cultivos líquidos se puede obtener después de 21-24 días. Sin embargo, los síntomas aparecen después de 10-15 días en ensayos de campo. Se sugiere que la fijiensina desempeña un papel secundario en la expresión de la enfermedad (62).

Sin embargo Stierle, A., *et al.* (1992), manifiestan que ni la fijiensina ni los tetralones son esenciales para la patogenicidad de *M. fijiensis* y que el hongo a de producir otros metabolitos que podrían constituir determinantes primarios de la enfermedad.

2.2.6. Selección in-vitro usando toxinas de *Mycosphaerella fijiensis*.

La selección in vitro se basa en exponer plantas, órganos, tejidos o células vegetales a patógenos o sus metabolitos, simulando la interacción huésped-patógeno que tiene lugar en la naturaleza. Este

tipo de metodologías plantean el uso de metabolitos producidos por el patógeno, que en algunos casos han demostrado tener el mismo efecto que el microorganismo.

Esta técnica de selección *in vitro* permite estandarizar la evaluación, haciéndola repetible y confiable, con la ventaja adicional de que en un espacio reducido y en un corto período se puede chequear la resistencia o tolerancia de gran cantidad de individuos (67).

Molina y Krausz (1989) realizaron la extracción de toxinas de filtrados del hongo con acetato de etilo y ensayaron la actividad fitotóxica de estos extractos sobre hojas de plantas en vivero de 7 cultivares de *Musa* spp. Mediante análisis comparativo del tamaño de las lesiones necróticas que se desarrollaron, estos autores determinaron el cultivar Gran Enano (AAA) como el más sensible a extractos fitotóxicos del hongo.

Por otra parte, ensayos realizados por Giménez, C. (2004) permitieron establecer que los cultivares resistentes son capaces de soportar concentraciones de toxinas hasta tres órdenes de magnitud superiores

(50 µg/mL) que las plantas susceptibles (0,05 µg/mL), determinándose que las toxinas del hongo *M. fijiensis* afectan la permeabilidad de la membrana plasmática en los cultivares susceptibles Williams (AAA) y Pisang Mas (AA).

En un estudio con toxinas encuentran que existen diferencias en la susceptibilidad a las toxinas entre suspensiones de células del mesófilo, con un DL50 de 25 µg/mL, mientras que en suspensiones de células embriogénicas el DL50 es de 539 µg/mL del extracto de toxinas. Como conclusión, estos autores proponen que los extractos de toxinas no son idóneos para la obtención de plantas resistentes mediante el uso de suspensiones embriogénicas y que probablemente se podría hacer una selección en tejidos fotosintéticos que son más sensibles a las toxinas (28).

Aplicando el cultivo de micro secciones de rizomas (400 µm) de plantas de Plátano Hartón (AAB), Williams (AAA) y Petite Naine (AAA), con una doble presión de selección utilizando el filtrado crudo del hongo y la toxina 2,4,8-trihidroxitetralona purificada. En este ensayo *in vitro*, estos autores lograron la selección de plantas resistentes al hongo en condiciones de vivero inoculadas con

suspensiones conidiales (4×10^4 conidio/mL) de *M. fijiensis*. Sin embargo, adicional a este reporte no se tienen informes del comportamiento de las mismas en campo (48).

Los intentos de generar plantas de banano resistente a la enfermedad, utilizando tanto las fracciones semipurificadas como fitotoxinas puras de *M. fijiensis* como herramientas de selección, no han sido exitosos (28), (48).

2.2.7. Manejo de la enfermedad

Desde la aparición de esta enfermedad, el control químico ha sido el más utilizado como medida de manejo para Sigatoka negra- Aunque efectivo, este no resulta costeable al pequeño agricultor y ocasiona un importante daño ambiental. En la actualidad, se continúa controlando la enfermedad mediante aspersiones aéreas de aceite más Benzimidazoles, Triazoles, Morfolinas y Dithiocarbamatos, en un ciclo permanente de control (7).

Lo anterior se complementa con el manejo integrado de labores, deshojes fitosanitarios durante el resto del año, mecanismos naturales

de defensa de la planta, equilibrada y completa nutrición, prácticas culturales adecuadas, buen drenaje y movimiento continuo de agua, oxígeno, nutrientes y CO₂ (13).

Durante la última década se ha investigado el uso de extractos vegetales, antagonistas y enmiendas orgánicas que puedan proporcionar protección más duradera, con menor toxicidad y resulten más viables económicamente (55). Debido a la importancia que la enfermedad de la Sigatoka negra representa para el cultivo de banano, se realizaron diversos estudios acerca del efecto de estos biofertilizantes líquidos sobre el desarrollo de *M. fijiensis*, agente causal de la enfermedad mencionada.

Dentro de las investigaciones realizadas se encuentran las de García y Apezteguía (2001), quienes estudiaron el efecto sobre plantas de banano de lixiviados de compost obtenidos a partir de desechos de banano. Estos autores encontraron que las plantas tratadas con el lixiviado presentaron un 45% menos de infección de Sigatoka negra comparado al testigo. El efecto de este producto fue atribuido a la presencia de ácidos orgánicos, en especial el ácido butanoico, cuyo contenido fue del 64.2% del total de compuestos presentes en el

lixiviado.

Trabajos realizados en el CIBE han demostrado que los biofertilizantes líquidos inhiben el crecimiento conidial y micelial de *M. fijiensis* en cultivos *in vitro*. (52), lo que ha sido corroborado en campo (33). Los resultados obtenidos constituyen una buena alternativa para el manejo de la enfermedad.

Otro sistema de control es la producción en sistemas de cultivos mixtos, ya sea de diferentes especies o bien del mismo banano pero combinando genotipos con diferentes grado de resistencia a la Sigatoka negra. Este sistema reduce la cantidad de inóculo al incrementar la biodiversidad de organismos como bacterias promotoras del crecimiento, antagonistas y competidores (8).

2.3. LA NUTRICIÓN MINERAL EN EL MANEJO DE LAS ENFERMEDADES.

Los nutrientes son clasificados como macro y micro nutrientes y aunque los requerimientos de las diferentes especies cultivadas pueden variar, resultan indispensables para el buen desarrollo de las plantas. De manera general, los elementos requeridos en mayor cantidad por las plantas son nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) es alta, seguidos por calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Los micronutrientes (hierro –Fe-, manganeso –Mn-, zinc –Zn-, cobre –Cu-, boro –B-, molibdeno –Mo- y cloro –Cl), son esenciales pero las plantas los requieren en pequeñas cantidades (23). Otros elementos como el níquel (Ni), selenio (Se), cobalto (Co) y silicio (Si) son beneficiosos para algunos cultivos específicos.

La influencia de la nutrición mineral en el desarrollo de las enfermedades en las plantas está bien estudiada especialmente en el caso de los macronutrientes (65). Sin embargo, algunos aspectos en los que se encuentran implicados los micronutrientes no han sido suficientemente estudiados o esclarecidos.

Los nutrientes están involucrados en diferentes procesos, como activación de enzimas y regulación de metabolismo, así como en los componentes estructurales (14). Se ha demostrado que las plantas con desbalance nutricional se convierten en más susceptibles a las enfermedades (29).

2.3.1. Funciones del Calcio Cobre y Boro en las plantas

El calcio (Ca) uno de los componentes estructurales de las células, de gran importancia en la membrana celular, interviene en la formación de oxalato, carbonato, fitato y calmodulinas. Como activador de enzimas, activa la ATPasa, α amilasa, fosfolipasa D y las nucleasas. Además, actúa en los siguientes procesos metabólicos: estructura y funcionamiento de las membranas, absorción iónica, relaciones hormonales y activación enzimática (54).

En las células vegetales el Ca^{2+} se encuentra principalmente asociado a estructuras en la pared celular o almacenado en el sistema de endomembranas. Este elemento es considerado como macronutriente para las plantas; el contenido en Ca^{2+} en las mismas

varía entre el 0.1 y el 5% del peso seco, dependiendo de las condiciones de crecimiento, especie y órgano (53).

Aparte de los requerimientos propios de cada tejido, y tomando en cuenta la concentración de otros componentes en la solución nutritiva (metales pesados, aluminio, cloruro de sodio, protones...), podría necesitarse un aporte extra de Ca^{2+} . Esto es debido a que el Ca^{2+} es fácilmente desplazado por otros cationes en la pared, debilitando su estructura (53). En cambio, en presencia de concentraciones elevadas de Ca^{2+} , se produce una acumulación del nutriente en las hojas, pero no en frutos y tubérculos. Para restringir el acceso del Ca^{2+} a estos órganos, la planta ha desarrollado varios sistemas que bien mantienen un nivel de Ca^{2+} reducido en el floema, o bien precipitan el Ca^{2+} con oxalato en los tubos cribosos o en la cubierta de la semilla. Otro sistema utilizado es la dilución del Ca^{2+} en el tejido por medio del crecimiento, al generarse nuevas zonas de unión de Ca^{2+} (53).

El calcio es un elemento que tiene muy poca o ninguna movilidad en los tejidos, y su movimiento dentro de la planta depende de un buen nivel interno de agua y temperaturas adecuadas, con una transpiración normal. Por tal motivo, cualquier factor que altere dichos procesos

puede causar desbalances de este elemento en el tejido, principalmente en puntos de crecimiento y frutos. La deficiencia de este elemento es común en presencia de exceso de nitrógeno o bien cuando hay falta o exceso de humedad. Excesos de magnesio pueden inducir también un desbalance de calcio en la planta (66).

Estudios realizados manifiestan que el calcio es un elemento importante y esencial para la formación y desarrollo inicial de todos los órganos y tejidos de las plantas; es indispensable para la formación de cada una de las células y su multiplicación y se requiere para la formación de la pared celular y la regulación de la integridad de las membranas, de forma tal que su carencia genera fuertes malformaciones, necrosis de hojas, aborto de flores y muerte de los puntos meristemáticos de algunos cultivos (66). Si la deficiencia es muy severa, los síntomas se acentúan hasta que las hojas se deforman casi desapareciendo la lámina foliar dando una apariencia de sierra. Los efectos de la deficiencia aguda de calcio pueden ser tan severos que la planta deja de emitir hojas y muere (39).

Es raro que el exceso de calcio se observe como toxicidad en las plantas. Los síntomas de amarillamiento de las hojas y manchas entre

las venas en hojas maduras son problemas fisiológicos relacionados con otros elementos como hierro, potasio y magnesio (3). Las relaciones de equilibrio que deben guardar el Ca, Mg y K son esenciales para una buena asimilación de nutrientes en la planta y tienen una analogía estrecha con la cantidad de calcio asimilable en el suelo (19). La disponibilidad de calcio depende del pH del suelo y puede ser reducida cuando este se encuentra por debajo de 5,5 (15).

Los iones de calcio tienen propiedades únicas y universales: capacidad de transmitir diversas señales que desencadenan acciones fisiológicas primarias en las células en respuesta a las hormonas, los agentes patógenos, la luz, la gravedad y factores de estrés. Es un mensajero de suma importancia, que resulta necesario en casi todas las etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas, desempeñando un papel fundamental en la regulación del crecimiento de células y tejidos vegetales y la adaptación a diversos factores de estrés. Muchas investigaciones han demostrado que la decodificación de señales de calcio es un elemento de la inducción del ABA para que se produzca el cierre estomático y la adaptación de plantas a la sequía, el frío, la salinidad y otros factores abióticos desfavorables (58).

La resistencia vegetal está estrechamente correlacionada con su contenido de calcio, como se muestra para plantas de frijol (Tabla 2). En el tejido infectado la actividad de las enzimas pectolíticas es muy alta pero está inversamente relacionada con el contenido de calcio en el tejido. La severidad de los síntomas de enfermedades también refleja el rol del calcio en la resistencia (10).

TABLA 2.

RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE CALCIO DEL FRÍJOL, LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PECTOLÍTICAS EN EL TEJIDO VEGETAL, Y LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD DE LA PUDRICIÓN BLANDA CAUSADA POR *ERWINIA CAROTOVORA*^A

Contenido de calcio (mg g ⁻¹ peso seco)	Actividad pectolítica (unidades relativas) ^b				Severidad de los síntomas ^c
	Poligalacturonasa		Pectato transeliminasa		
	-	+	-	+	
6.8	0	62	0	7.2	4
16	0	48	0	4.5	4
34	0	21	0	0	0

Fuente: Berry *et al.* 1988

La “mancha de madurez” de los frutos de banano es un desorden fisiológico que se lo atribuye a una absorción baja de calcio por parte de la planta en épocas secas. Varios reportes científicos demuestran la relación estrecha de la enfermedad con las deficiencias de calcio (19). El calcio confiere a las plantas mayor resistencia a ciertos patógenos vasculares y a las pudriciones blandas, posiblemente por su efecto estabilizador de sustancias pépticas, haciéndolas más resistentes a la acción de las enzimas pépticas (5).

Se ha comprobado que un exceso de nitrógeno puede causar susceptibilidad a enfermedades como la *Botrytis* en fresa (*Fragaria sp.*) y tomate (*Lycopersicum esculentum*), la cual puede contrarrestarse con aplicaciones de calcio, elemento que provoca el endurecimiento de los tejidos (66).

El boro (B) es un componente estructural de la pared celular y forma parte de complejos con difenoles, carbohidratos y azúcares. Es componente de las ATPasas de las membranas celulares y de las sintetisas del glicano. Los procesos metabólicos en los que actúa el boro son la absorción iónica, el transporte de carbohidratos, la síntesis

de lignina y celulosa, la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (54).

Estudios histológicos de plantas crecidas bajo deficiencia de boro mostraron desorganización de la pared celular, así como un aumento en el tamaño del poro de la pared, efectos que desaparecieron con la adición de boro al medio de cultivo. Estos estudios mostraron una relación directa entre la estabilización de la pared y el boro (53).

Algunos autores manifiestan que este micronutriente regula la formación de la pared celular, al favorecer su lignificación (38) y se encuentra implicado junto al calcio en el metabolismo de la pared celular (30).

El boro es un elemento que es requerido en el transporte de azúcares dentro de las plantas, las cuales lo contienen en pequeñas cantidades en sus tejidos; también tiene influencia sobre la división celular, por lo que es necesario en los puntos de crecimiento. La deficiencia de este elemento está ligada con coloraciones verde azulosas intensas en las zonas de deficiencia, además de provocar problemas en la buena

formación de los tejidos vasculares de las plantas, principalmente el floema, posiblemente debido a la insuficiencia de azúcares requeridos para su formación. Con la carencia de este elemento ocurren síntomas de malformación de hojas, tallos y frutos, y una mala polinización, ya que se requiere boro para un buen llenado de los granos de polen (66). El boro es absorbido por la planta como H_3BO_3 y $B(OH)_4^-$ - y no se transloca fácilmente de un órgano a otro (31).

Por otra parte se ha determinado que el boro reduce enfermedades causadas por *Plasmiodiophora brassicae* en crucíferas; *Fusarium solani* en frejol; *Verticillium albo-atrum* en tomate; *Gaeumannomyces graminis* en algodón (16) y *Blumeria graminis* en trigo (43).

Un aspecto de interés es la relación B- Ca^{2+} . Se ha observado la existencia de una interacción entre ambos elementos en diversos organismos. Así, se ha demostrado que el calcio puede evitar el daño causado por la deficiencia en boro en la estructura del heterocisto, encargada de fijar el nitrógeno libre. Por otro lado, de una manera recíproca también se ha observado que el boro puede recuperar la deficiencia de calcio, indicando un papel sinérgico del boro y del calcio en cianobacterias (53).

En el ámbito de la simbiosis Rhizobium–leguminosas, la adición de calcio a plantas de guisante noduladas deficientes en boro, favorece la movilización del micronutriente desde tejidos viejos a tejidos jóvenes. De acuerdo con ello, determinaciones de la concentración de boro en nódulos desarrollados en plantas deficientes en boro, mostraron un incremento del micronutriente en tejido cuando se suministró a las plantas un suplemento extra de calcio, aunque no cuando se añadían cantidades extras de otros cationes como magnesio y potasio, indicando una interacción entre el boro y el calcio para el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis (53).

La interacción entre el boro y el calcio es un aspecto importante en los estudios de nutrición mineral de plantas. Ambos nutrientes poseen características comunes: baja movilidad, reducida concentración citoplasmática, alteración del crecimiento ante la deficiencia, función estructural en pared. De hecho, desde hace más de medio siglo se considera la relación calcio-boro como indicador del estado nutricional de las plantas (53).

Es común en el cultivo de apio (*Apium graveolens*), el desarrollo acelerado de los pecíolos provocando falta de calcio y boro, por lo que esta deficiencia se previene o compensa con aplicaciones de éstos dos elementos que trabajan muy bien en sinergia. Además se sabe que es mejor acompañar las aplicaciones de calcio con boro ya que el boro ayuda al calcio a su movilización dentro de la planta (66).

De alguna manera el boro y el calcio co-actúan en la membrana celular, se sabe que el calcio en la membrana está estabilizado por las cargas negativas en el ramnogalacturonano suministradas por el boro, El boro forma los enlaces borato-diéster más estables con furanósidos con un grupo cis-diol y en la naturaleza sólo cumplen estas características la apiosa y la ribosa. La apiosa forma parte de uno de los componentes principales de la fracción pectídica de la pared, el Ramnogalacturonano II (RG-II), el cual normalmente se encuentra en forma dimérica, precisamente gracias a los enlaces borato-diéster que establece el boro con las dos cadenas de RG-II a través de sus residuos apiosa respectivos (53). De ahí que en su ausencia de las cargas negativas en el ramnogalacturonano suministradas por el boro, el calcio sea desplazado y pase al apoplasto. Por medio de estudios

químicos, se descubrió que el calcio puede formar complejos con polihidroxicarboxilatos unidos a través de enlaces borodiéster (53).

Aunque inicialmente se consideró que el calcio interactuaba con el átomo de boro directamente, análisis espectroscópicos realizados sobre dímeros de boro–ramnogalacturonano II desmintieron esa idea, indicando que el calcio se une a grupos hidroxilo o a grupos carboxilo presentes en la molécula de ramnogalacturonano II. Actualmente se propone que el calcio promueve la formación de dímeros de boro–ramnogalacturonano II en la pared y que su unión por medio de enlaces iónicos y coordinados en la región del ácido poligacturónico los estabiliza (53).

La primera molécula enlazada por borato identificada en el reino de las plantas es la ramnogalacturonano II (RGII), un componente péctico de la pared celular estable en condiciones fisiológicas, la cual es un dímero donde el boro une dos monómeros de RGII a través de un puente borato para proporcionar estabilidad a la matriz de la pared celular (Figura 2) (49).

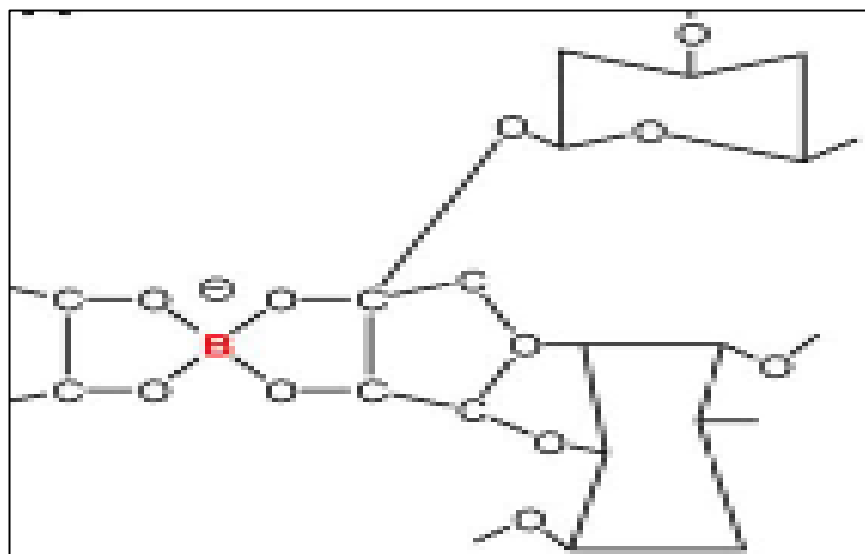


FIGURA 2. COMPLEJO B-RAMNOGALACTURONANOII

(Fuente: O'Neill *et al*, 2004).

El cobre (Cu) es un componente estructural que forma parte de las siguientes proteínas: anurina, estelacianina, umecianina, y glicoproteínas. También es constituyente de las enzimas: oxidasa de ascorbato, polifenoloxidasas cosidazas, creolasas y tirosinas. Entre los procesos metabólicos en que participa están la fotosíntesis, respiración, regulación hormonal y metabolismo de compuestos secundarios (54).

El cobre es un microelemento que participa en la síntesis de lignina, un compuesto que causa endurecimiento de los tejidos, además su presencia en la planta puede disminuir el ataque a enfermedades y plagas (66).

Este elemento ayuda a lignificar los tejidos infectados por hongos, también promueve la función de fenoles que son sustancias con propiedades antifúngicas (54). El exceso de cobre puede provocar principalmente deformaciones de la raíz. Sin embargo, López, y Solís (1992) encontraron que las deformaciones de las raíces como resultado de los altos niveles de cobre en el suelo no afectaron la productividad del cultivo.

La deficiencia de cobre se caracteriza por detención del crecimiento, el tallo se dobla por una lignificación deficiente, que resulta de un nivel insuficiente de cobre para el funcionamiento de la enzima lignina-oxidasa, necesaria para la síntesis de lignina (30).

Factores como exceso de nitrógeno en zonas con alto contenido de materia orgánica en el suelo y lluvias intensas; exceso de fósforo;

alcalinidad del suelo o condiciones de elevada humedad, evitan la adecuada absorción del cobre por la planta. El cobre en las plantas es absorbido como Cu^{2+} , o como complejo orgánico (Cu-EDTA, por ejemplo), por vía radical o foliar. No es muy móvil, aunque puede desplazarse en cierta proporción de las hojas viejas a las jóvenes. Este traslado depende del estado en que se encuentra, y del grado de deficiencia que la planta presente. En los casos agudos queda prácticamente inmóvil.

Aunque el cobre se puede detectar en los distintos órganos del vegetal, es en las hojas verdes donde se halla en mayor concentración. Se admite que el 70% se encuentra básicamente localizado en el aparato mitocondrial ; las semillas son órganos con alta concentración de este micronutriente.

Una amplia fertilización con fosfato disminuye grandemente el contenido de cobre en las hojas; una reacción similar ocurre con el hierro y zinc (47). El ión cobre en cualquiera de sus formas, mono o divalente, actúa en el control de plagas y enfermedades, de ahí la eficacia que muestran los fungicidas cúpricos. De igual forma, si se mantienen niveles óptimos de nutrientes con un buen manejo

agronómico, es posible reducir al mínimo la probabilidad de desarrollo de enfermedades en los cultivos, independientemente de los factores climáticos propicios para el desarrollo de los patógenos. Muchos de los hongos que atacan a diferentes cultivos como por ejemplo el hongo *Phytophthora sp.* en el cacao, la roya en el café o la antracnosis en el mango pueden ser controlados al manejar niveles adecuados del elemento cobre en la planta (47).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), ubicado en el Campus Politécnico Gustavo Galindo, en Guayaquil.

3.1. EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO, COBRE Y BORO SOBRE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE VITROPLÁNTULAS DE BANANO DE LA VARIEDAD WILLIAMS.

Se utilizaron 150 propágulos de la variedad de banano Williams, los que fueron obtenidos del laboratorio de Biología Celular del CIBE, el material vegetal seleccionado mostró tener características de calidad idóneas para el estudio. Una vez que se contó con los propágulos necesarios para la investigación, se procedió a preparar los nueve tratamientos bajo diferentes concentraciones de calcio, cobre y boro (Tabla 3). Los medios fueron dispensados en tubos de ensayos de 15 cm. de largo por 2.5 cm. de diámetro con tapas rosca, los que fueron colocados en gradillas para mantener su posición; seguidamente se los esterilizó a 121⁰C durante 25 minutos. Los medios fueron

colocados en repisas por una semana previa a la siembra de los propágulos para observar que no existiera contaminación por microorganismos. Transcurrido este período, se hizo uso de una cámara de flujo laminar para realizar la siembra de los propágulos en los tubos de ensayos. Una vez realizada la siembra, los nueve tratamientos fueron colocados en gradillas etiquetadas conforme al tratamiento y se las ubicó en un cuarto de crecimiento con luz permanente, a temperatura ambiente (Figura 3).



FIGURA 3. CÁMARA DE CRECIMIENTO *IN-VITRO* DE PLÁNTULA.

Para medir el efecto de las concentraciones de calcio, cobre y boro en el desarrollo de las vitroplántulas se mantuvo el ensayo durante 45 días. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Altura de las plantas in-vitro (cm.)
- Número de hojas
- Largo y ancho de hoja (cm.)
- Número de raíces
- Largo de la raíz principal (cm.)

Los datos se tomaron cada ocho días, a excepción del largo y ancho de hoja, que se determinó al finalizar el ensayo. Terminado este ensayo, las hojas de las plántulas fueron utilizadas para realizar las inoculaciones con conidias y concentrado crudo tóxico de *M. fijiensis* (Figuras 4 y 7).

Diseño experimental y modelo matemático

El diseño experimental utilizado se muestra en la (Tabla 4). El modelo matemático empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \left\{ \begin{array}{l} i=1,2,\dots,9 ; \text{ donde } \varepsilon_{ij} \sim N(\mu, \sigma^2), \\ j=1,2,\dots,15 \end{array} \right.$$

Donde:

(i) representa los 8 tratamientos que estuvieron conformados por las diferentes mezclas de calcio, cobre y boro, más el control.

(j) representa cada una de las observaciones (15 plantas) que se evaluaron en los respectivos tratamientos.

Se estableció el supuesto matemático que el error o residuos siguen una distribución normal con media $\mu=0$ y varianza σ^2 .

Para el experimento en estudio se hizo uso de un diseño Unifactorial (un solo factor) de efectos fijos, donde cada nivel del factor corresponde a las diferentes combinaciones de las concentraciones

de cobre, boro y calcio, siendo los mismos un total de 9 tratamientos, uno por cada nivel del factor. En cada uno de los tratamientos se estudiaron 15 unidades experimentales (plantas), que crecieron bajo las mismas condiciones, con la finalidad de que no existieran perturbaciones que influyan o alteren el comportamiento de las variables que se estudian, evitando la necesidad de determinar otro factor perturbador.

TABLA 4

MODELO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Diseño del Experimento			
<p>Tratamiento 1</p> <p>179.8Ca₁+0.00954Cu₁ mg/L</p>	<p>T₁P₁ T₁P₂</p> <p>T₁P₃</p> <p>T₁P₄ T₁P₅</p>	<p>T₁P₆ T₁P₇</p> <p>T₁P₈</p> <p>T₁P₉ T₁P₁₀</p>	<p>T₁P₁₁ T₁P₁₂</p> <p>T₁P₁₃</p> <p>T₁P₁₄ T₁P₁₅</p>
<p>Tratamiento 2</p> <p>239.8Ca₂+0.01272Cu₂ mg/L</p>	<p>T₂P₁ T₂P₂</p> <p>T₂P₃</p> <p>T₂P₄ T₂P₅</p>	<p>T₂P₆ T₂P₇</p> <p>T₂P₈</p> <p>T₂P₉ T₂P₁₀</p>	<p>T₂P₁ T₂P₁</p> <p>T₂P₁</p> <p>T₂P₁ T₂P₁</p>
<p>Tratamiento 3</p> <p>179.8Ca₁+1.62B₁ mg/L</p>	<p>T₃P₁ T₃P₂</p> <p>T₃P₃</p> <p>T₃P₄ T₃P₅</p>	<p>T₃P₆ T₃P₇</p> <p>T₃P₈</p> <p>T₃P₉ T₃P₁₀</p>	<p>T₃P₁₁ T₃P₁₂</p> <p>T₃P₁₃</p> <p>T₃P₁₄ T₃P₁₅</p>
<p>Tratamiento 4</p> <p>239.8Ca₂+2.16B₂ mg/L</p>	<p>T₄P₁ T₄P₂</p> <p>T₄P₃</p> <p>T₄P₄ T₄P₅</p>	<p>T₄P₆ T₄P₇</p> <p>T₄P₈</p> <p>T₄P₉ T₄P₁₀</p>	<p>T₄P₁₁ T₄P₁₂</p> <p>T₄P₁₃</p> <p>T₄P₁₄ T₄P₁₅</p>

<p>Tratamiento 5</p> <p>0.00954Cu₁+1.62B₁ mg/L</p>	<p>T₅P₁ T₅P₂</p> <p>T₅P₃</p> <p>T₅P₄ T₅P₅</p>	<p>T₅P₆ T₅P₇</p> <p>T₅P₈</p> <p>T₅P₉ T₅P₁₀</p>	<p>T₅P₁₁ T₅P₁₂</p> <p>T₅P₁₃</p> <p>T₅P₁₄ T₅P₁₅</p>
<p>Tratamiento 6</p> <p>0.01272Cu₂+1.62B₂ mg/L</p>	<p>T₆P₁ T₆P₂</p> <p>T₆P₃</p> <p>T₆P₄ T₆P₅</p>	<p>T₆P₆ T₆P₇</p> <p>T₆P₈</p> <p>T₆P₉ T₆P₁₀</p>	<p>T₆P₁₁ T₆P₁₂</p> <p>T₆P₁₃</p> <p>T₆P₁₄ T₆P₁₅</p>
<p>Tratamiento 7</p> <p>179.8Ca₁+0.000954Cu₁+ 1.62 B₁ mg/L</p>	<p>T₇P₁ T₇P₂</p> <p>T₇P₃</p> <p>T₇P₄ T₇P₅</p>	<p>T₇P₆ T₇P₇</p> <p>T₇P₈</p> <p>T₇P₉ T₇P₁₀</p>	<p>T₇P₁₁ T₇P₁₂</p> <p>T₇P₁₃</p> <p>T₇P₁₄ T₇P₁₅</p>
<p>Tratamiento 8</p> <p>239.8Ca₂+0.01272Cu₂+ 2.16 B₂ mg/L</p>	<p>T₈P₁ T₈P₂</p> <p>T₈P₁</p> <p>T₈P₁ T₈P₁</p>	<p>T₈P₁ T₈P₁</p> <p>T₈P₁</p> <p>T₈P₁ T₈P₁</p>	<p>T₈P₁ T₈P₁</p> <p>T₈P₁</p> <p>T₈P₁ T₈P₁</p>
<p>Control Medio MS</p>	<p>T₉P₁ T₉P₂</p> <p>T₉P₃</p> <p>T₉P₄ T₉P₅</p>	<p>T₉P₆ T₉P₇</p> <p>T₉P₈</p> <p>T₉P₉ T₉P₁₀</p>	<p>T₉P₁₁ T₉P₁₂</p> <p>T₉P₁₃</p> <p>T₉P₁₄ T₉P₁₅</p>

Análisis Estadístico

Para el análisis de los parámetros durante el tiempo, se obtuvo el área bajo la curva (ABC), valor matemático calculado para los parámetros medidos en una serie de tiempo (Apéndice i).

Con los valores obtenidos del Área Bajo la Curva, se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA), técnica estadística que permite identificar de manera general si existe al menos un par de tratamientos que sean estadísticamente diferentes, es decir que haya algún efecto entre las mezclas usadas en cada nivel del factor; si la tabla ANOVA indica que hay al menos un factor que difiere de los demás, se realiza una comparación entre cada uno de los promedios para establecer cuál de ellos tienen efectos diferentes; para esto se empleó la prueba estadística de Duncan para datos con varianzas homogéneas, al 5% de significancia, las que permitieron identificar las diferencias entre tratamientos (17).

3.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO, COBRE Y BORO SOBRE EL DESARROLLO DE LA INFECCIÓN DE SIGATOKA NEGRA EN TEJIDOS FOLIARES DE VITROPLÁNTULAS.

Proceso de obtención de conidias in-vitro.

Para la obtención de las conidias se procedió de acuerdo a la metodología estandarizada por el laboratorio de Fitopatología del CIBE-ESPOL, la misma que se detalla a continuación (33).

Ascosporas de *M. fijiensis*, fueron sembradas en un medio PDA en el

que después de siete días a 26⁰C y en completa oscuridad se formaron colonias monoascospóricas (Apéndice E). Estas colonias se pasaron a un medio Micophyl, en el que permanecieron por 20 días bajo las mismas condiciones antes mencionadas (Apéndice E). Transcurrido este período se depositaron las colonias en una solución de agua- tween 20 (Apéndice E) y mediante vórtex se obtuvo una solución de micelios. Los micelios fueron sembrados en medio agar V8 (Apéndice E). Luego de siete días a 26⁰C y con luz continua (4,000 Lux \pm 200) se obtuvieron las conidias, después se tomaron las colonias individuales y se colocaron en solución agua-tween 20 y se aplicó vórtex para desprender las conidias, se las mantuvo a 16⁰C hasta su uso.

Conteo de Conidias

Para las inoculaciones con conidias se procedió a determinar su concentración mediante una cámara de Neubauer. Se tomó con una pipeta pasteur aproximadamente una gota del medio que contenía las conidias y se la colocó en la cámara de Neubauer; posteriormente se procedió a contar el número de conidias que se observaban en los extremos de cada cuadrante y en el centro. El mismo proceso se hizo con el cuadrante inferior. Obteniéndose una suspensión de 3000

conidias /ml.

Inoculación con conidias

Para realizar las inoculaciones con conidias se procedió a tomar una hoja por cada observación teniendo un total de 15 hojas por cada tratamiento, las mismas que fueron colocadas en cajas Petri que contenían medio de conservación de tejidos (Apéndice E)- Posteriormente se procedió a realizar las inoculaciones en los tejidos foliares, depositando 25ul de la solución conidial . Las cajas petri con el material inoculado fueron colocadas en una cámara de crecimiento con condiciones de luz permanente y temperatura (25°C), para un buen desarrollo del hongo. La figura 4 muestra gráficamente el proceso de inoculación que se llevó a cabo.

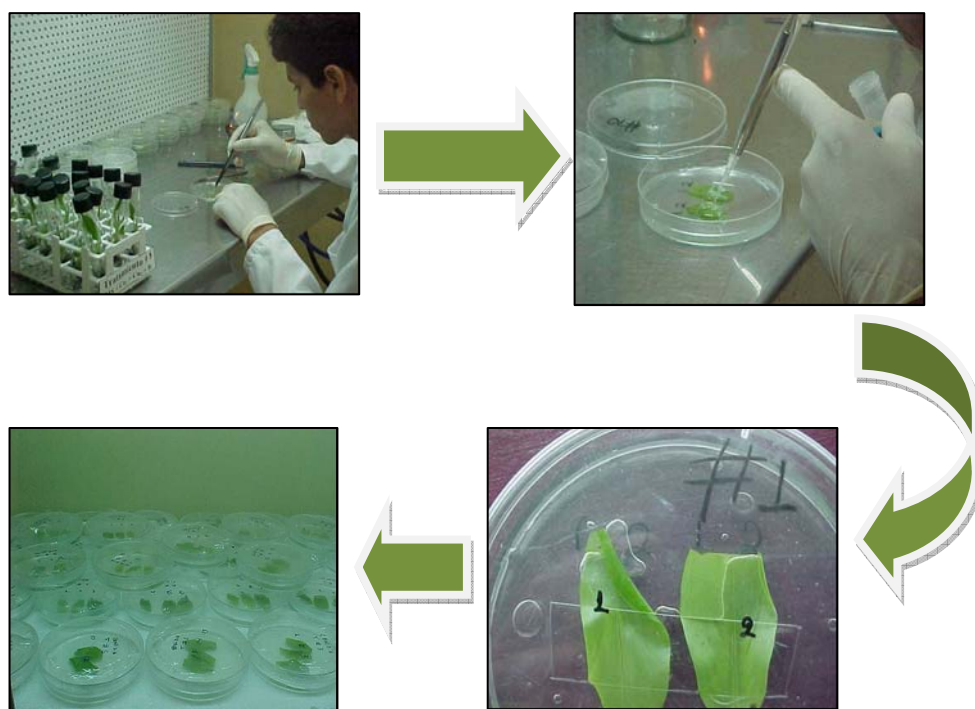


FIGURA 4. INOCULACIÓN CON CONIDIAS DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* EN TEJIDOS FOLIAR *IN-VITRO* DE BANANO VARIEDAD WILLIAMS

Se realizaron cuatro evaluaciones en total. La primera a los 15 días de la inoculación y las restantes cada 15 días. Los daños fueron cuantificados usando la escala de Alvarado, *et al.* (2003), que se describe a continuación:

0 = Síntomas de hojas en su mayor parte ausentes

1 = Manchas rojizas en la parte inferior de la superficie de la hoja no presencia de síntomas en la parte superior.

2 = Manchas circulares rojizas regulares o irregulares en la parte inferior de la hoja

3 = Puntos difusos de color café claro sobre la parte superior de la hoja

4 = Puntos negros o cafés circulares, posiblemente con un halo amarillo sobre la parte superior de la hoja

5 = Puntos negros con un centro gris seco. Hojas completamente necróticas.

La Figura 5 muestra los síntomas típicos que se tuvieron como referentes para la aplicación de la mencionada escala, en particular, de los grados 2 al 5.

A partir de los síntomas observados en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos, se clasificó su reacción:

Resistente: 0-1

Parcialmente resistente: 2-3

Susceptible: 4-5

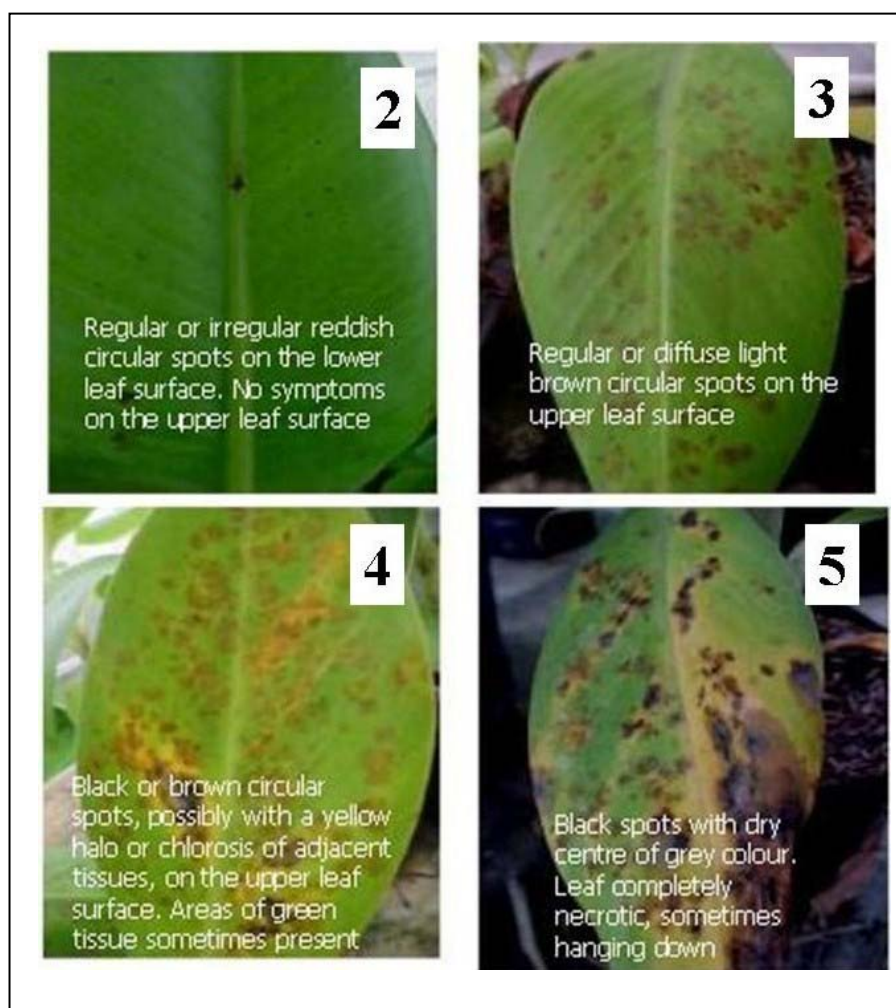


FIGURA 5. EVOLUCIÓN DE LOS SÍNTOMAS DE LA SIGATOKA NEGRA BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO (FOTO CIBE-ESPOL)

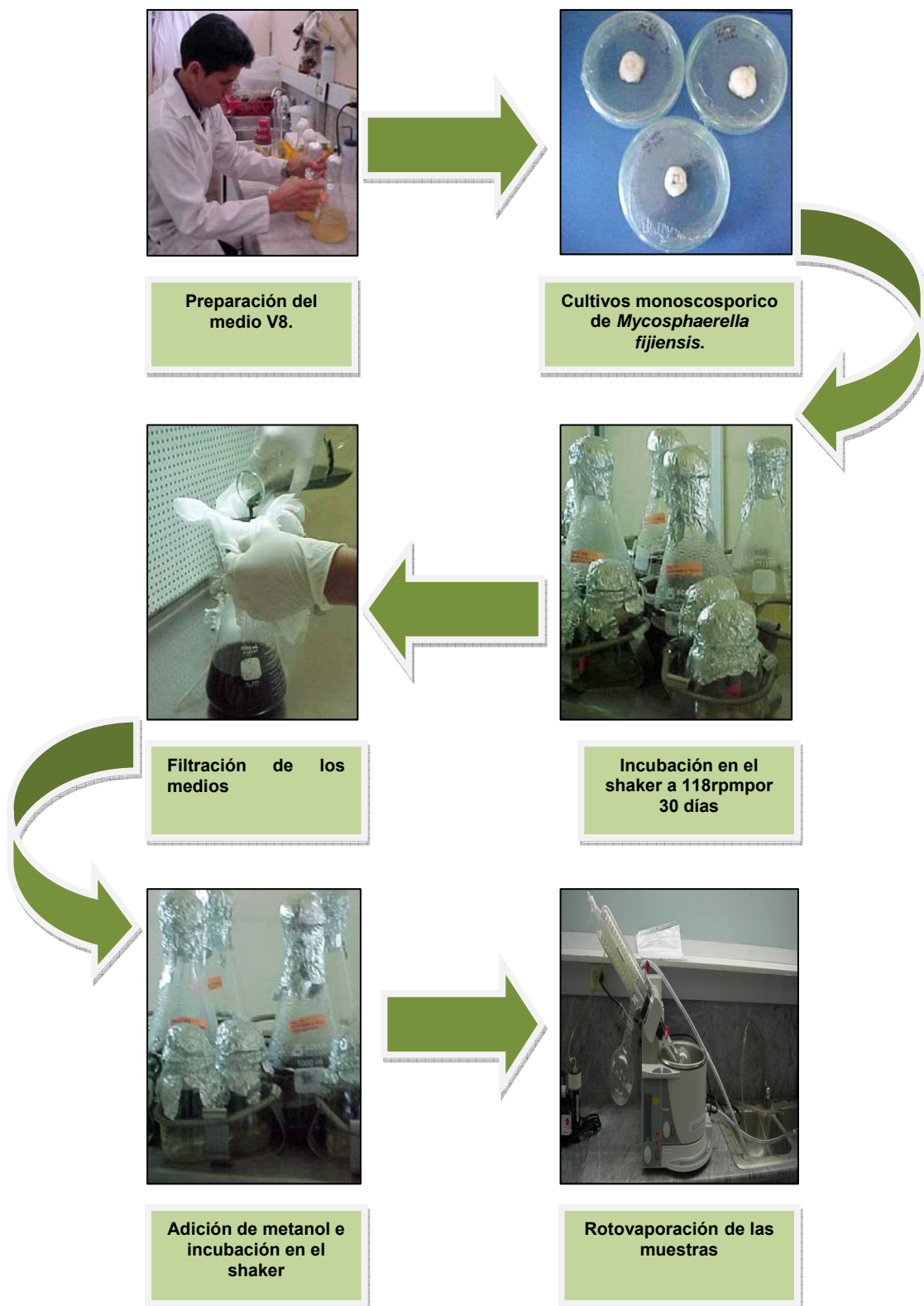
Análisis Estadístico

Para analizar los datos del experimento se usó la técnica estadística de KRUSKAL WALLIS, que permite identificar de manera general si existe al menos un par de tratamientos que difieren estadísticamente en cuanto a su frecuencia estadística, es decir, que haya algún efecto entre las mezclas usadas en cada nivel del factor, y si la prueba indica que hay diferencias estadísticas, se realiza una comparación entre cada uno de los promedios para establecer cuál de ellos tienen efectos diferentes. Mediante la prueba de rango de las medias del área bajo la curva (Apéndice i) se pudo identificar las diferencias entre tratamientos (17). Adicionalmente, se realizó la prueba Chi-cuadrado para determinar la independencia o no entre los tratamientos y los niveles de infección de las plantas inoculadas.

3.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO, COBRE Y BORO SOBRE LAS LESIONES OCASIONADAS POR LOS CONCENTRADO CRUDOS TÓXICOS DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* EN TEJIDOS FOLIARES DE VITROPLÁNTULAS.

Proceso de obtención del concentrado crudo toxico (CCT)

Para la obtención del concentrado crudo tóxico se procedió de acuerdo a la metodología descrita por (Molina y Krausz, 1989). Se partió de una colonia de cultivo monoascospórico de *M. fijiensis* de la cual se tomó una pequeña porción de la masa micelial y se sembró en un medio PD-V8 líquido (Apéndice E). Este medio se lo mantuvo durante un mes en agitación constante para garantizar el crecimiento del hongo y la producción de metabolitos secundarios. Transcurrido ese período, se procedió a la concentración mediante un proceso de rotovaporación (Apéndice E), el cual se esquematiza en la Figura 6. El mismo proceso se le dio al medio que sirvió como testigo, con la diferencia que no se inoculó el hongo de *M. fijiensis* (44).



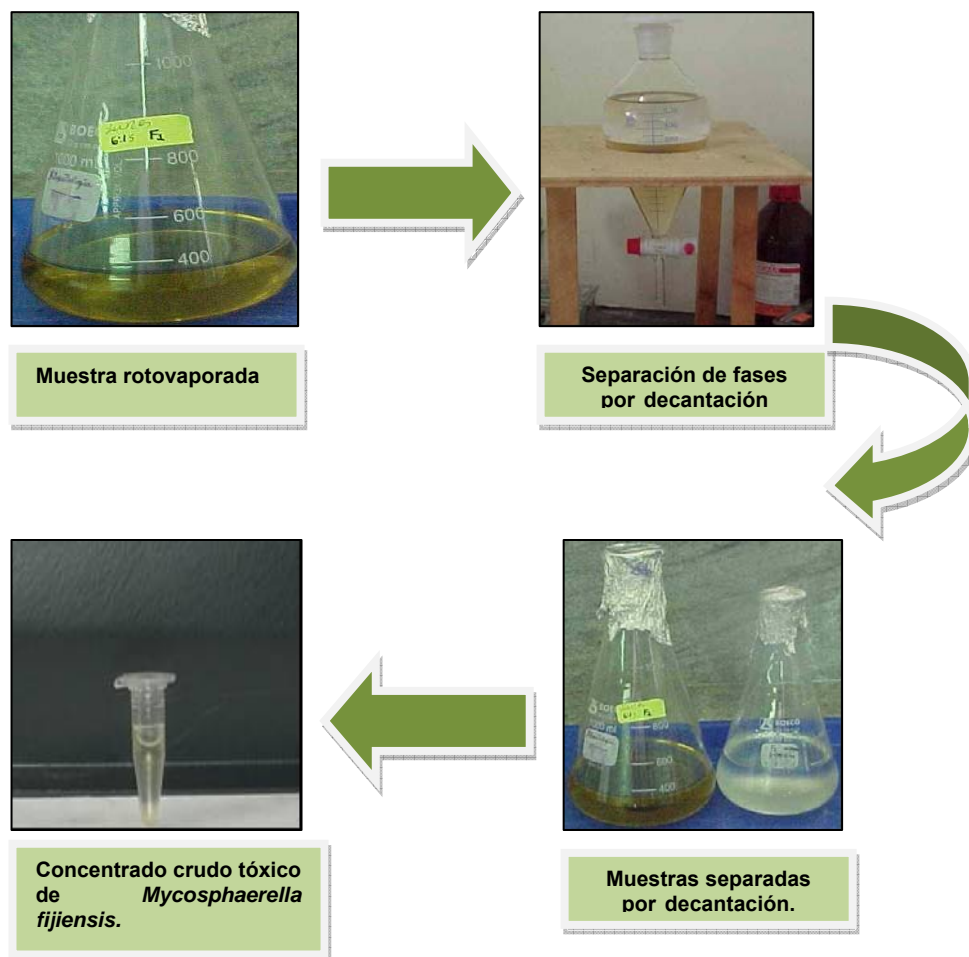


FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCESO UTILIZADO PARA LA OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO CRUDO TÓXICO DE *MYCOSPHAERELA FIJENSIS*.

Inoculación con CCT

Para realizar las inoculaciones con el concentrado crudo tóxico de *M. fijiensis*, se procedió a tomar una hoja por cada observación teniendo

un total de 15 hojas por cada tratamiento, las mismas que fueron colocadas en cajas petri que contenían medio de conservación de tejidos (Apéndice E). Posteriormente se procedió a realizar las inoculaciones en los tejidos foliares, para lo cual se depositaron 2ul del inoculó, que fueron esparcidos por la superficie de la hoja. Lo mismo se hizo con varias muestras para evaluar el efecto del concentrado obtenido del medio liquido PD-V8 sin inocular colonias *M. fijiensis* que sirvió de testigo en este proceso. Las cajas petri con el material inoculado fueron colocadas en una cámara de crecimiento con luz constante (lux) y manteniendo una temperatura de 25 °C. La Figura. 7 muestra esquemáticamente el proceso seguido

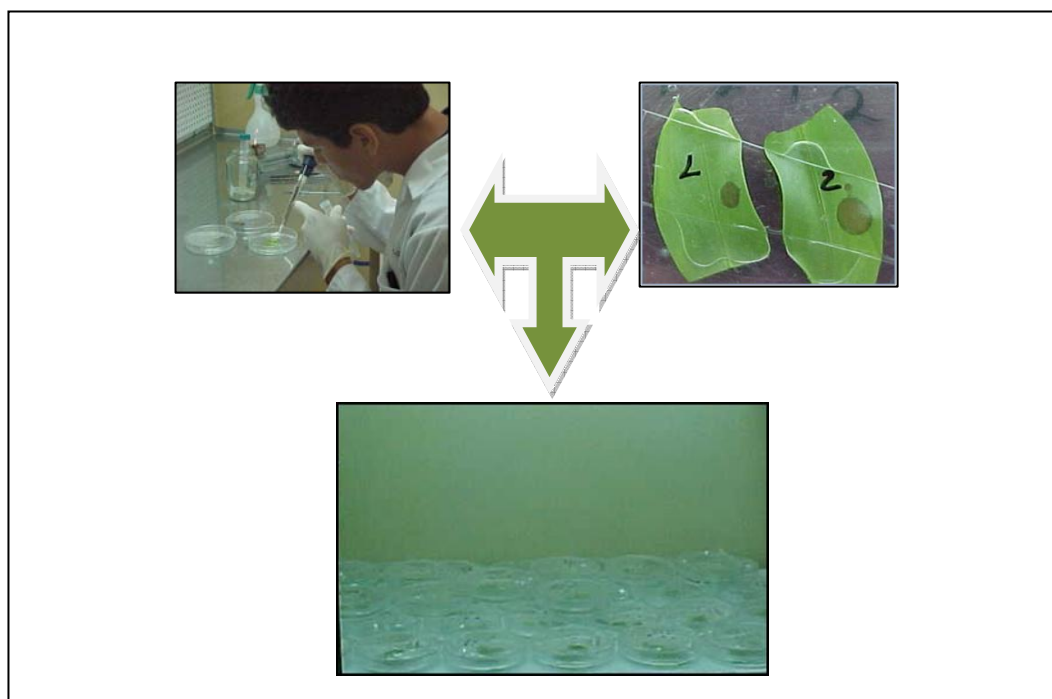


FIGURA 7. INOCULACIÓN CON CONCENTRADO CRUDO TÓXICO DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* EN TEJIDOS FOLIAR *IN-VITRO* DE BANANO VARIEDAD WILLIAMS.

La evaluación de los daños ocasionados por el CCT de *M. fijiensis* en todos los tratamiento (incluyendo los extractos de medio sin inocular), fueron realizadas a las 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas después de la inoculación, siguiendo la escala de evaluación estandarizada por el laboratorio de Fitopatología del CIBE (25), que se describe a continuación:

0 = Sin síntomas

1 = Clorosis foliar ligera (1-50%)

2 = Clorosis foliar Fuerte (51-100%)

3 = Necrosis foliar ligera (1-50%)

4 = Necrosis foliar fuerte (51-100%)

5 = Muerte total del tejido

Análisis Estadístico

Se aplicaron las mismas pruebas utilizadas en el análisis de los datos de inoculación con conidias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO, COBRE Y BORO SOBRE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO.

4.1.1. Efecto del calcio, cobre y boro sobre el parámetro altura

De manera general, los tratamientos no presentaron diferencias significativas con el control a excepción del T4 (Ca₂ B₂). Sin embargo, al analizar el factor concentración entre los tratamientos, se observa un patrón similar donde se evidenciaron promedios menores de altura en las concentraciones altas de los elementos estudiados (Grafico 1).

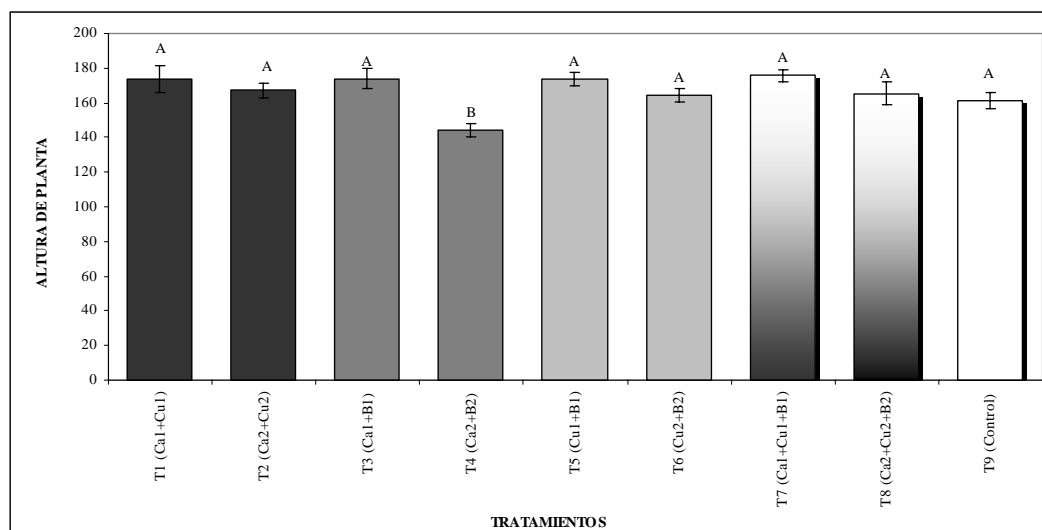


GRAFICO 1. AREA BAJO LA CURVA (ABC) DEL PARAMETRO ALTURA DE PLANTA ($n = 15$) QUE CRECIERON EN CONDICIONES CONTROLADAS DURANTE 45 DIAS. LOS TRATAMIENTOS FUERON APLICADOS EN EL MEDIO BASE MURASHIG SHOOK, REPRESENTANDO ESTE EL CONTROL. BARRAS CON IGUALES LETRAS NO DIFIEREN ESTADISTICAMENTE POR LA PRUEBA DE DUNCAN ($p > 0.05$).

Además, se observó que en el tratamiento donde las concentraciones de calcio y boro se aumentaron a la mitad de las que se usa en el control, el parámetro altura fue relativamente superior al control; mientras que, en el tratamiento donde se duplicaron las cantidades del calcio y boro el parámetro altura tendió a decrecer en relación al tratamiento control, este resultado confirma lo expresado por Redondo, M. *et al* 2007, que la relación calcio-boro y sus concentraciones pueden ser considerados como indicador del buen

desarrollo de las plantas.

4.1.2. Efecto del calcio, cobre y boro sobre el número de hojas

El número de hojas (Grafico 2) fue afectado significativamente por los tratamientos en estudio y el control. El patrón entre concentraciones de cada tratamiento fue diferente al parámetro altura, es decir concentraciones medias presentaron menor número de hojas, con excepción de los tratamientos T3 y T4 (Ca_1B_1), (Ca_2B_2) respectivamente, los cuales tuvieron un comportamiento inverso al resto. También cabe destacar que el tratamiento 1 difirió del control medio MS y de los tratamientos T2, T3, T7, y T8.

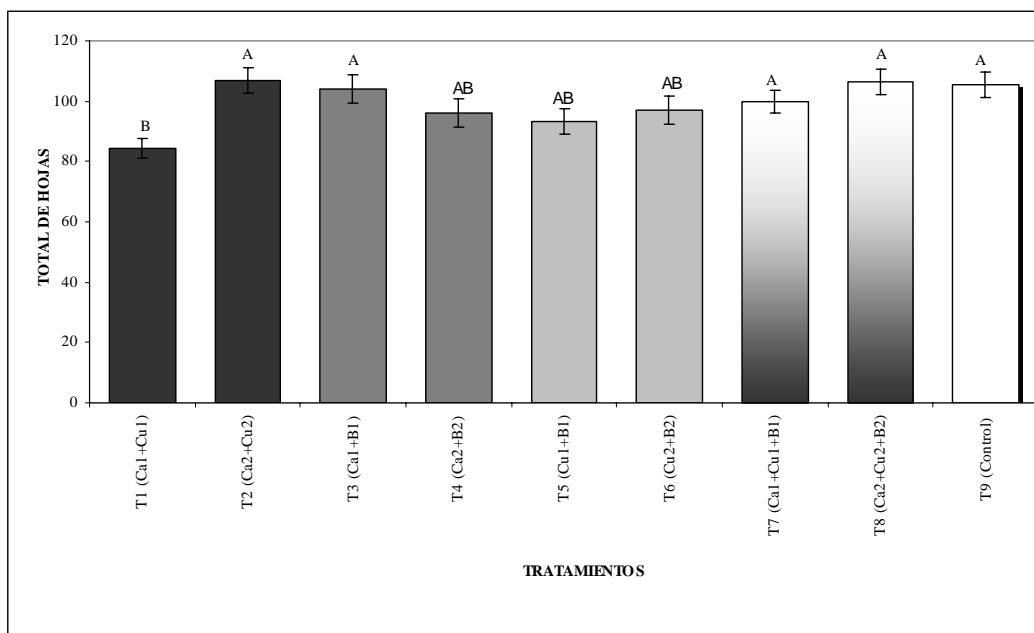


GRAFICO 2. AREA BAJO LA CURVA (ABC) DEL PARAMETRO NÚMERO DE HOJAS POR PLANTA ($n = 15$) QUE CRECIERON EN CONDICIONES CONTROLADAS DURANTE 45 DIAS. LOS TRATAMIENTOS FUERON APLICADOS EN EL MEDIO BASE MURASHIG SHOOK, REPRESENTANDO ESTE EL CONTROL. BARRAS CON IGUALES LETRAS NO DIFIEREN ESTADÍSTICAMENTE POR LA PRUEBA DE DUNCAN ($p > 0.05$).

4.1.3. Efecto del calcio, cobre y boro sobre el largo de hoja

El Gráfico 3 representa los resultados obtenidos del análisis del parámetro largo de hoja. Encontrándose que no existe diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y el control se observo adicionalmente que las concentraciones medias de todos los tratamientos estudiados, tuvieron un efecto similar al grupo de plantas que fueron sembradas en el medio MS, el mismo que esta constituido por todos los elementos nutritivos esenciales para el normal

crecimiento del vegetal en ese periodo. Por otro lado, el tratamiento 4 (Ca_2B_2), demostró el promedio más bajo, el mismo que viene manteniendo un comportamiento inferior en los otros parámetros.

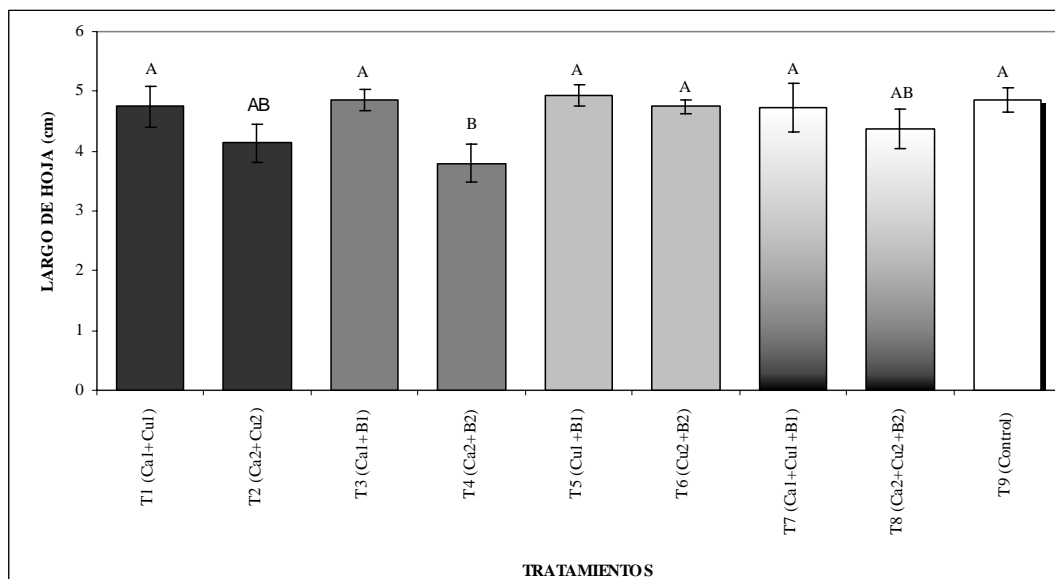


GRAFICO 3. LARGO DE HOJA DE PLANTAS DE BANANO ($n = 15$) QUE CRECIERON EN CONDICIONES CONTROLADAS DURANTE 45 DIAS. LOS TRATAMIENTOS FUERON APLICADOS EN EL MEDIO BASE MURASHIG SHOOK, REPRESENTANDO ESTE EL CONTROL. BARRAS CON IGUALES LETRAS NO DIFIEREN ESTADISTICAMENTE POR LA PRUEBA DE DUNCAN ($p > 0.05$).

4.1.4. Efecto del calcio cobre y boro sobre el parámetro ancho de la hoja

Este parámetro no fue afectado significativamente por ninguno de los tratamientos, en relación con el control. Lo que representa el poco o ningún efecto directo de los factores estudiados sobre este parámetro

(Grafico 4).

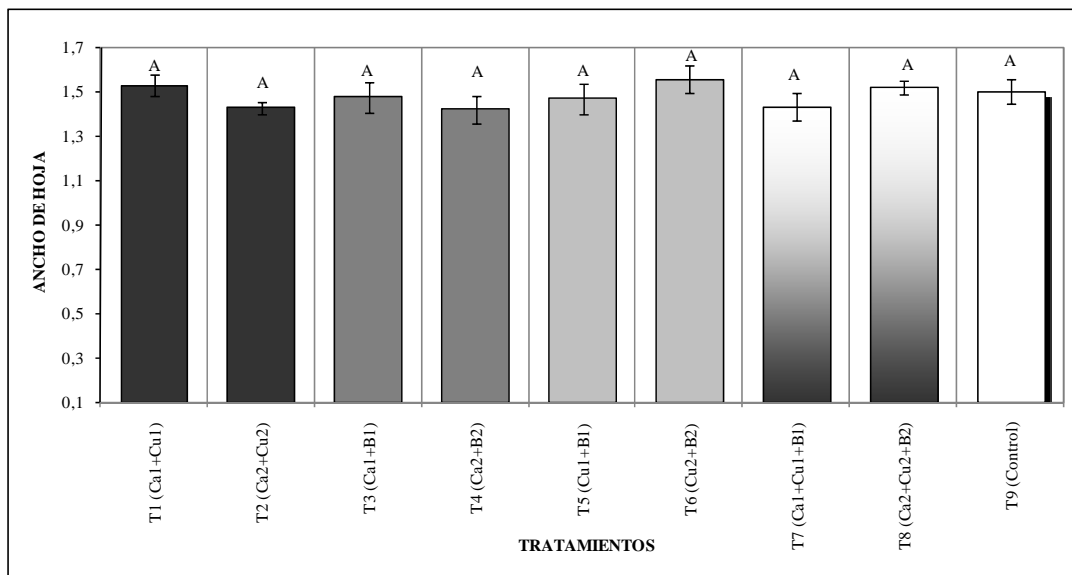


GRAFICO 4. ANCHO DE HOJA DE PLANTAS DE BANANO (n = 15) QUE CRECIERON EN CONDICIONES CONTROLADAS DURANTE 45 DIAS. LOS TRATAMIENTOS FUERON APLICADOS EN EL MEDIO BASE MURASHIG SHOOK, REPRESENTANDO ESTE EL CONTROL. BARRAS CON IGUALES LETRAS NO DIFIEREN ESTADISTICAMENTE POR LA PRUEBA DE DUNCAN ($p > 0.05$).

En el parámetro número de hojas se pudo observar que cuando se duplicó las concentraciones de los tres elementos en relación al testigo se logró mantener el mismo ritmo foliar que el testigo. Lo que en una visión general, confirma la necesidad de estos nutrientes para el buen desarrollo del tejido foliar, sin que se haya observado ningún efecto fitotóxico, estos resultados están vinculados parcialmente a lo manifestado por Redondo, M. *et al* (2007), quien sostiene que en

concentraciones elevadas de Ca^{2+} , se produce una acumulación del nutriente en las hojas. Mientras que para los parámetro largo y ancho de hojas los tratamientos formados por cobre y boro son lo que mejor respuesta presentan en relación a los demás tratamientos a pesar de no existir significancia estadística, estos resultados corroboran de manera parcial lo expresado por Navarro, G. (2003) quien sostiene que las hojas con buen estado fisiológico es donde se acumula la mayor concentración de cobre.

4.1.5. Efecto del calcio cobre y boro sobre el número de raíces

La presencia de todos los elementos en estudio en los tratamientos 7 ($\text{Ca}_1 \text{Cu}_1 \text{B}_1$) y 8 ($\text{Ca}_2 \text{Cu}_2 \text{B}_2$), independiente de la concentración, presentaron un comportamiento similar al tratamiento control (T9-MS). Respuesta que confirma la importancia de todos los elementos para un normal desarrollo de este parámetro de crecimiento. Sin embargo, concentraciones superiores de cada uno de los otros tratamientos, evidenciaron influencia positiva en el desarrollo del número de raíces (Grafico 5).

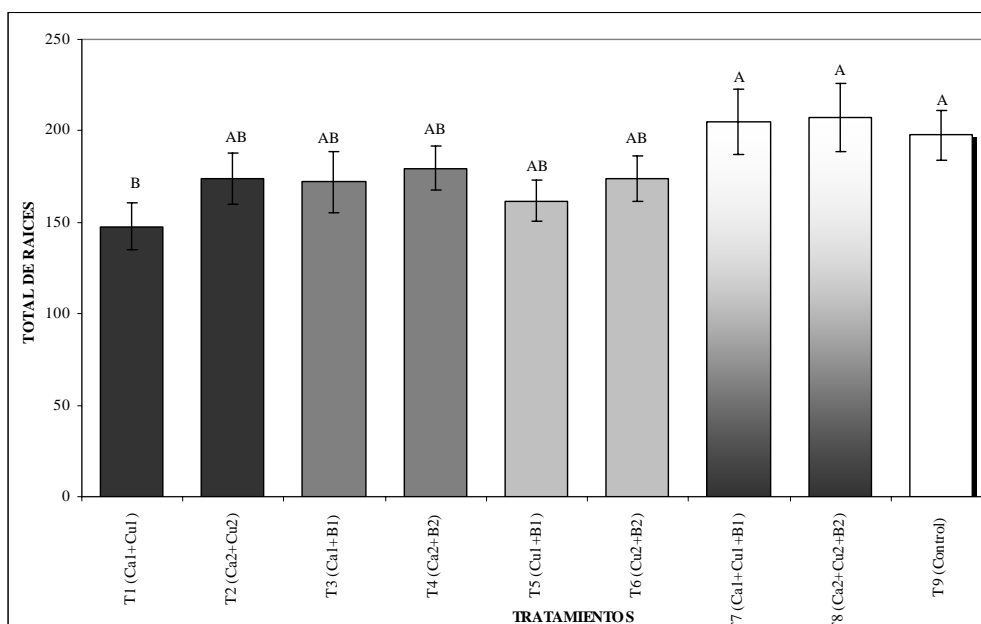


GRAFICO 5. AREA BAJO LA CURVA DEL TOTAL DE LAS RAICES EN PLANTAS DE BANANO (n = 15) QUE CRECIERON EN CONDICIONES CONTROLADAS DURANTE 45 DIAS. LOS TRATAMIENTOS FUERON APLICADOS EN EL MEDIO BASE MURASHIG SHOOK, REPRESENTANDO ESTE EL CONTROL. BARRAS CON IGUALES LETRAS NO DIFIEREN ESTADISTICAMENTE POR LA PRUEBA DE DUNCAN ($p > 0.05$).

4.1.6. Efecto del calcio, cobre y boro sobre la longitud de la raíz principal

La longitud de la raíz principal fue uno de los parámetros de crecimiento con mayor diferencia significativa entre los tratamientos y el control. El efecto de la concentración, siguió un patrón referencial con respecto a la menor y mayor dosis, en los tratamientos 1 y 2 donde el Ca y el Cu participaron así como en los tratamientos 3 y 4 donde Ca y B fueron combinados, grupo en el cual además se obtuvo

la mayor longitud de raíces. Mientras que en el tratamiento 5 y 6 donde se combinaron el Cu y el B ocurrió un efecto inverso a los tratamientos anteriores en la mayor concentración se obtuvo un mejor desarrollo de la raíz principal. Contrariamente, las combinaciones de los tres elementos y sus dosis en estudio, presentaron uno de los efectos menos significantes de los tratamientos. Manteniendo su influencia positiva el tratamiento control (T9) basado en el uso del medio MS el mismo que fue uno de los mejores para este parámetro evaluado (Grafico 6).

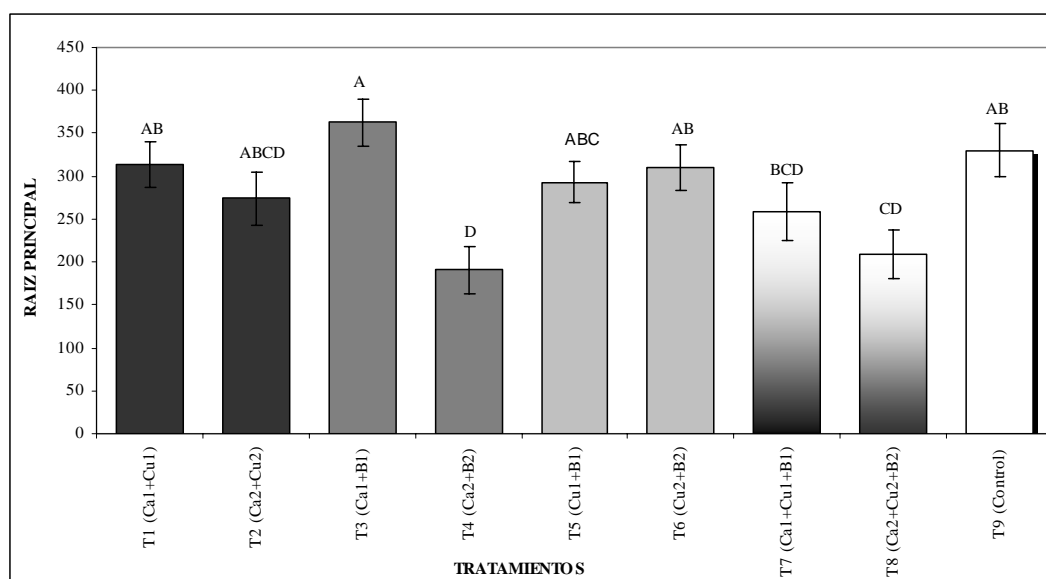


GRAFICO 6. AREA BAJO LA CURVA DE LA LONGUITUD DE LA RAIZ PRINCIPAL DE PLANTAS DE BANANO (n = 15) QUE CRECIERON EN CONDICIONES CONTROLADAS DURANTE 45 DIAS. LOS TRATAMIENTOS FUERON APLICADOS EN EL MEDIO BASE MURASHIG SHOOK, REPRESENTANDO ESTE EL CONTROL. BARRAS CON

IGUALES LETRAS NO DIFIEREN ESTADISTICAMENTE POR LA PRUEBA DE DUNCAN ($p>0.05$).

El efecto sobre parámetros relacionados con las raíces demostraron que en los tratamientos donde se aumento la concentración del calcio, cobre y boro a la mitad y al doble de la que se usa normalmente en el tratamiento control reflejaron una tendencia superior , a pesar de no existir significancia estadística. Esto se atribuye a que estos elementos actúan en diferentes procesos metabólicos entre ellos las relaciones hormonales (Ríos, R., & Corella, F.1999). Mientras que para el desarrollo de la raíz principal la mejor combinación fue la del tratamiento donde se aumento la concentración del calcio y boro a la mitad de la que se usa en el control medio MS este resultado concuerda con lo expresado por investigadores como Janez J. 2002 y Redondo, M. et al 2007, autores que sostienen que estos dos elementos en dosis adecuada ayudan eficientemente al desarrollo vegetal.

4.2. EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIÓN DE CALCIO, COBRE Y BORO SOBRE EL DESARROLLO DE LA INFECCIÓN POR CONIDIAS DE *MYCOSPHARELLA FIJIENSIS* EN TEJIDOS FOLIARES DE VITROPLANTULAS.

La inoculación dirigida de conidias de *M. fijiensis* sobre los discos de hojas de las plántulas de banano tratadas con las combinaciones de micronutrientes y el grupo de plantas control, no presentaron diferencias estadísticas significativas (Tabla 5). Mientras que, la representación de las medianas (Grafico 7), manifestaron la variabilidad de los datos obtenidos para esta medición. Sin embargo, de manera general se puede observar en esta grafica que los tratamientos 1 (Ca1 Cu1), 2 (Ca2 Cu2), y 9 (MS) presentaron los valores más altos de infección.

TABLA 5.

TEST DE KRUSKAL WALLIS DEL AREA BAJO LA CURBA DE LAS INOCULACIONES CON CONIDIA DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*.

Test de Kruskal Wallis	
ABC - Conidias	
Chi-Square	5.110
df	9.000
Asymp. Sig.	0.825

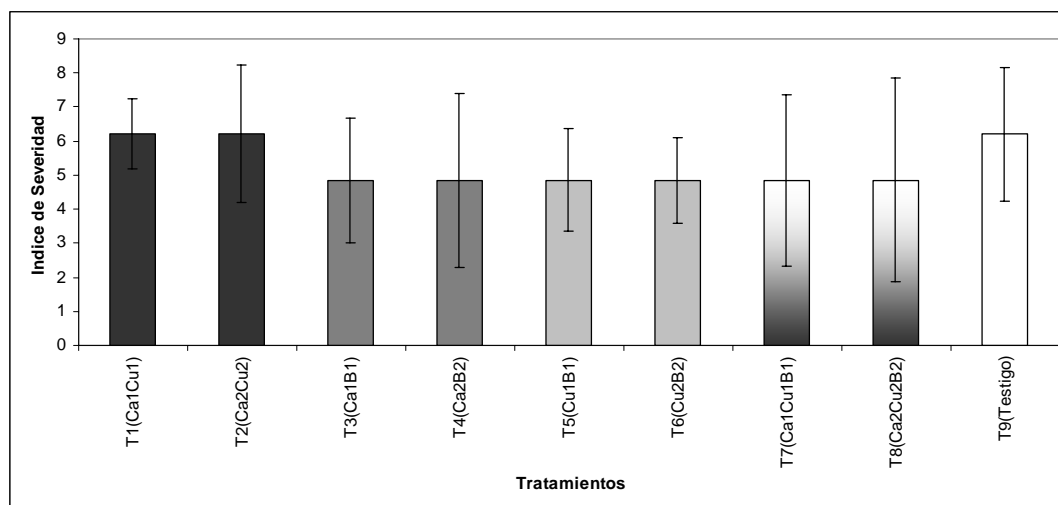


GRAFICO 7. INDICE DE SEVERIDAD PARA LAS INOCULACIONES CON CONIDIAS DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*.

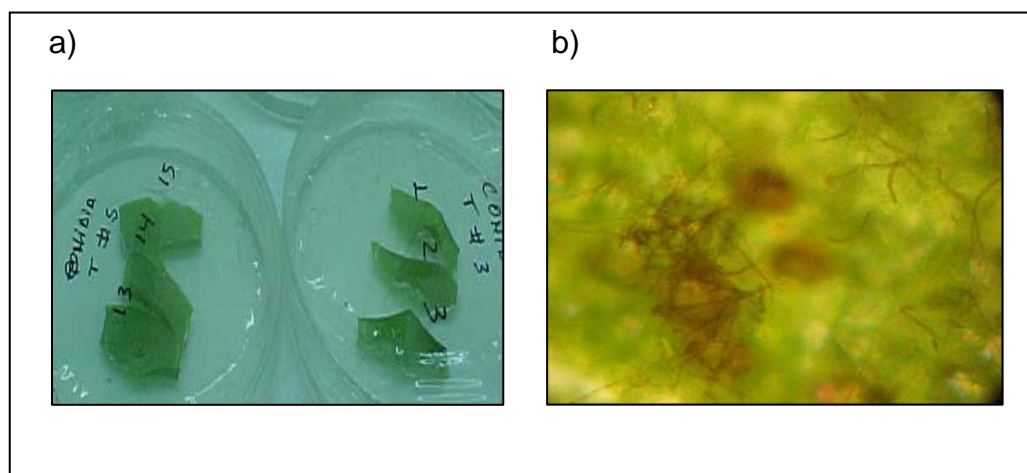


FIGURA 8. SINTOMAS CAUSADOS EN LOS TEJIDOS FOLIARES POR LAS INOCULACIONES CON CONIDIAS DE *M. FIJIENSIS*. LITERAL A. SÍNTOMAS OBSERVADOS A SIMPLE VISTA Y LITERAL B. OBSERVADAS AL MICROSCOPIO DE LUZ.

4.3. EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO, COBRE Y BORO SOBRE LAS LESIONES OCASIONADAS POR EL CONCENTRADO CRUDO TÓXICO DE *MYCOSPHARELLA FIJENSIS* EN TEJIDOS FOLIARES DE VITROPLANTULAS DE BANANO DE LA VARIEDAD WILLIAMS.

En el caso de las inoculaciones con CCT de *M. fijiensis*, los resultados reflejaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Tabla 6). Se puede evidenciar que la presencia de los tres elementos en estudio en el tratamientos 8 (Ca² Cu² B²), determinaron menor daño del tejido después de la inoculación con el concentrado del patógeno, lo que se presume fue un efecto beneficioso por el uso de la concentración de los elementos combinados en este tratamiento. Estos resultados ponen en evidencia una vez más que los elementos calcio cobre y boro en concentraciones adecuadas, producen un efecto de fortalecimiento en las membranas celulares impidiendo la destrucción de las células por factores adversos (Grafico 8).

TABLA 6.

TEST DE KRUSKAL WALLIS DEL AREA BAJO LA CURBA DE LAS INOCULACIONES CON CONCENTRADO CRUDO TÓXICO DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*

Test Kruskal Wallis	
ABC-Toxinas	
Chi-Square	59,519
df	9,000
Asymp. Sig.	0,000

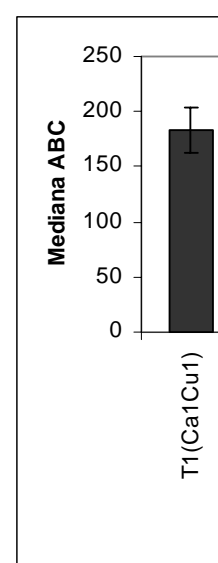


GRAFICO 8. MEDIANA ABC PARA LAS INOCULACIONES CON EXTRACTO CRUDO TOXICO DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*.

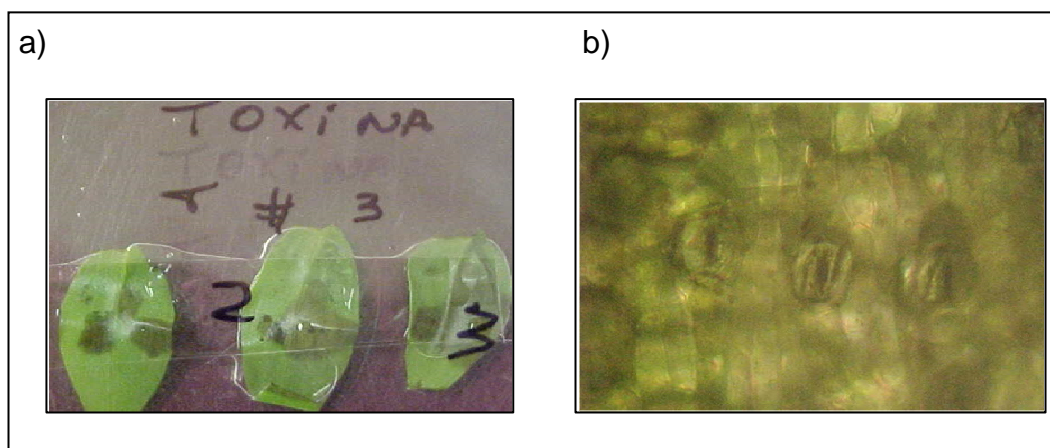


FIGURA 9. SINTOMAS CAUSADOS EN LOS TEJIDOS POR LAS INOCULACIONES CON CONCENTRADO CRUDO TOXICO DE *MYCOSPHAERELLA FIJENSIS*. LITERAL A. SÍNTOMAS OBSERVADOS A SIMPLE VISTA Y LITERAL B. OBSERVADAS AL MICROSCOPIO DE LUZ.

Varios autores como Berry et al. (1988), Arenas, (2007), Dixon, (1996), Marschner, (1995), Navarro, (2003) y Yáñez, (2002), han señalado que en presencia de calcio, cobre y boro puede disminuir el ataque de plagas y enfermedades en las plantas.

Por los resultados obtenidos se puede evidenciar que las conidias mostraron reproducir la enfermedad a nivel in-vitro de manera similar a la que se produce a nivel in-vivo. Lo que demuestra una vez más que esta fuente de inóculo es uno de los principales causantes de la enfermedad de Sigatoka negra en banano, corroborando lo expuesto

por Burt, et al., (1997).

Los resultados obtenidos mediante las inoculaciones con el concentrado crudo tóxico de *Mycosphaerella fijiensis* ponen en evidencia una vez más que los elementos calcio cobre y boro en concentraciones adecuadas tratamiento ocho, producen un fortalecimiento en las membranas celulares impidiendo la destrucción de las células por factores adversos lo que concuerda con lo expresado por investigadores como Berry et al. 1988; Redondo, M. et al 2007 y Yáñez, J. 2000 que la resistencia vegetal está estrechamente correlacionada con el contenido de calcio, cobre y boro en las plantas.

Mediante las inoculaciones con concentrado crudo tóxico, se pudo evaluar en nivel de daño ocasionado por este producto en 150 plántulas en 48 horas por los resultados obtenidos concuerdo con lo expresado por Yoder, (1980) quien manifiesta que hacer estudios con toxinas a nivel in-vitro tiene una gran ventaja porque en un espacio reducido y en un corto período se puede chequear la resistencia o tolerancia de gran cantidad de individuos.

Análisis Multivariado

Con el objetivo de encontrar explicación a la variabilidad entre los parámetros evaluados, se realizó el análisis de componentes principales. Los resultados obtenidos determinaron un total de 8 componentes principales, de los cuales fueron seleccionados los tres primeros por explicar un 63% de la variabilidad (Tabla 7).

TABLA 7.

TOTAL DE COMPONENTES PRINCIPALE DE LAS VARIBLES ESTUDIADAS.

Componentes	Valores Propios		
	Total	% de varianza	% acumulado
1	2.121	26.513	26.513
2	1.916	23.952	50.465
3	1.031	12.890	63.355
4	0.908	11.355	74.710
5	0.713	8.918	83.628
6	0.644	8.047	91.675
7	0.442	5.519	97.194
8	0.224	2.806	100

En detalle, en el componente 1, se presentó mayor incidencia positiva de los parámetros largo de hoja y largo de raíz principal, seguido por el ancho de la hoja y el daño por toxina; mientras que, hubo incidencia negativa de los parámetros: total de hojas, número de raíces y daño

por conidias, siendo muy baja para la variable altura. El componente 2, contrariamente al 1, tuvo una incidencia positiva alta con las variables altura, total de hojas, ancho de hojas y número de raíces, baja con largo de hoja largo de raíz principal y daño por conidias mientras que la incidencia fue negativa con daño por toxinas (Tabla 8). Sin embargo, el componente 3 agrupó incidencias positivas altas únicamente con la evaluación sanitaria tanto para daño por conidias como por tóxicas. Resumiendo se demuestra que de los tres componentes principales los dos primeros agrupan los parámetros agronómicos; mientras que el componente 3 agrupa las evaluaciones sanitarias con ambas estructuras del patógeno; esto indica que la mayor variabilidad (50.5%) del total de los datos se dan por los parámetros agronómicos y poca variabilidad (12.9%) por los parámetros sanitarios.

TABLA 8.

MATRIZ DE COMPONENTES PRINCIPALES

Parámetros	Componentes		
	1	2	3
Altura	0.090	0.762	-0.124
Total de hojas	-0.274	0.711	-0.026
Largo de hojas	0.766	0.261	-0.188
Ancho de hojas	0.468	0.512	0.145
Numero de raíces	-0.643	0.614	-0.005
Largo de la raíz principal	0.840	0.197	0.008
Daño por conidias	-0.152	0.243	0.762
Daño por toxinas	0.302	-0.156	0.615

5. CONCLUSIONES RECOMENDACIONES

Y

CONCLUSIONES

1. Se evidenció el efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de los elementos calcio, cobre y boro sobre los parámetros de desarrollo de las vitroplántulas de banano "Williams", aunque sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a al medio MS comercial.
2. Las concentraciones menores de los elementos evaluados demostraron un efecto positivo sobre el desarrollo del parámetro altura en el material vegetal bajo las condiciones ensayadas.
3. Los tres elementos estudiados en concentraciones altas incrementaron la producción de raíces en las vitroplántulas de banano, variedad Williams.
4. La concentración menor de la combinación calcio- boro resultó mejor para el desarrollo de la raíz principal, mientras que la concentración mayor, de

manera general, influyó negativamente en todos los parámetros evaluados.

5. La combinación de los elementos cobre y boro, en ambas concentraciones, favorecieron de manera similar el desarrollo de largo y ancho de hojas.
6. El desarrollo de la Sigatoka negra en las muestras inoculadas con conidias se vio afectada por la combinación y concentración de los tres elementos estudiados.
7. La combinación en la concentración mayor de los tres elementos bajo estudio impidió el desarrollo de grandes lesiones producto de la inoculación con el concentrado crudo tóxico de *Mycosphaerella fijiensis*.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar las investigaciones en la temática, tanto *in-vitro* como en invernadero, a través de estudios histológicos que permitan determinar la contribución de los elementos nutricionales al desarrollo de la pared celular vegetal en banano.
2. Realizar estudios básicos de los mecanismos y los compuestos sintetizados por elementos nutricionales, tales como la lignina, celulosa, ácido ribonucleico, proteínas, relaciones hormonales, entre otros.
3. Realizar estudios en campo con el objetivo de evaluar programas de fertilización con diferentes niveles de macro y microelementos, en materiales de Musáceas con diferente expresión a la Sigatoka negra.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G. 1995. Fitopatología. 2da ed. Editorial Limusa, S.A. México. p 838.
2. Alarcón, J. 2002. Reconocimiento de enfermedades virales en plátano y banano en la granja Montelindo, Municipio de Palestina Caldas. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Fitotecnia. Manizales, Colombia.
<http://acad.ucaldas.edu.co>
3. Almodóvar, W. 1998. Enfermedades de los Hidropónicos. Colegio de Ciencias Agrícolas. Universidad de Puerto Rico. <http://www.uprm.edu>
4. Alvarado, Y. 2003. Early Evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. In: Jacome L., Lepoivre P., Marin D., Ortiz R., Romero R., and Escalant J.V. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Montpellier, France, INIBAP.

5. Arenas, A. 2007. Evaluación de enfermedades de plantas. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Casilla 23. Arequipa-Perú
<http://www.senasa.gob.pe>

6. Arias de López, M., y Bonilla, G. 1998. Enemigos naturales de insectos, plagas del banano. En procedimiento de la XIII Reunión de ACORBAT, Ecuador 98. Guayaquil, Ecuador. p482.

7. Becerra, E. 2005. Manejo de Formulaciones de Dithane para el control de Sigatoka negra en Banano, Dow AgroScience, publicado en Banana export, año 6, Edición No. 21. 22 – 23.

8. Benalcázar, S. 1991. El cultivo del plátano en el trópico: Manual de asistencia técnica No. 50. (S. Benalcázar, J. Toro y R. Jaramillo, eds.). ICA, CIID, Comité de Cafeteros de Colombia, INIBAP. Cali, Colombia. p376.

9. Bennett, R., and Phil, A., 2005. Sigatoka negra. Cornell University.
<http://www.apsnet.org>

10. Berry et al. 1988. La arveja. Enfermedades bacterianas y virales.
<http://arveja.awardspace.com>

11. Burt, P., Rutter, J., and González, H. 1997. Short distance windborne dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain. *Plant pathology*. 46: 451-458.

12. Chica, E. 2005. Evaluación del Efecto del Butóxido de Piperonilo y de sus Mezclas con Tres Fungicidas Triazoles sobre el Crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en Condiciones de Laboratorio. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la producción. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. p95.

13. Cooz, R., y Chávez, L. 1992. Informe Técnico sobre la situación actual de la Sigatoka negra en el sur del Lago de Maracaibo. UNISUR-FONAIAP. Chama, Venezuela. p10.

14. Daurob, S., and Snyder, G. 2007. Chemistry of plant nutrients in soil, In: Datnoff L.E., Elmer W.H., and Huber D.M. (eds.), *Mineral Nutrition and*

Plant Disease. APS Press-The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U.S.A.

15. Díaz, A. 2007. Metabolismo del calcio y su relación con la “Mancha de madurez” del fruto de banano. Una revisión. Ingeniera agrónoma, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia 25(2), 280-287.
16. Dixon, G. 1996. Repression of the morphogenesis of *Plasmodiophora brassicae* Wor. by boron – A review. *Acta Horticulturae*. 407, 393-401.
17. Douglas, C. Montgomery. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo editorial Iberoamérica. México, México. pp70-112.
18. Douglas, M., and Ronald, R. El combate de la Sigatoka negra. Boletín No 4. Departamento de investigaciones CORBANA 1992. p22.
19. Espinosa, J., y Mite, F. 2002. Estado actual y futuro de la nutrición y fertilización del banano. *Informaciones Agronómicas del Instituto de la*

Potasa y el Fósforo 48, p5.

20. FAO. 2005. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Agriculture data base. <http://faostat.fao.org>.

21. Frison, E. 2003. Rescuing the banana. www.newscientist.com

22. Frison, E., y Sharrock, S. 2000. Biodiversidad y producción sostenible del banano. La importancia de los bananos y plátanos: <http://www.banafair.de>

23. Fritz, A. 1985. Micronutrient Supply: Growing problems in the cultivation of high value crops in arid zones. *Acta Horticulturae* 158, 293-306.

24. García, E., y Apezteguia, H. 2001. Estudio de lixiviado de compost y su efecto sobre el control de Sigatoka negra, *M. fijiensis*, Morelet y el crecimiento del cultivo de banano. Tesis de grado (Ing. Agrónomo). Guácimo, Costa Rica. p121.

25. García, L. et al. 1997. Metodología para la selección In-vitro de *M. fijiensis* en Banano. INIBAP, Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y del Plátano. 6: 14 -15.
26. Gavilán, J. 2008. Principales plagas y enfermedades del cultivo de banano. <http://bananasite.galeon.com>
27. Giménez, C., y Colmenares, M. 2004. Evaluación in-vitro de la resistencia a las toxinas de *Mycosphaerella fijiensis* en Musa spp. CIEN, dic. 2004, vol.12, no.4, 251-257.
28. Harelimana, G. 1997. Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to black leaf streak. Euphytica. 89:125-128.
29. Henn, A. 2004. The plant doctor: plant disease and fertilization. Mississippi State University Extension Service. Department of Agriculture. Published in furtherance of Acts of Congress.

30. Hernandez, R. 2002. Nutrición mineral de las plantas. Departamento de Botánica. Facultad de Ciencias Ambientales y Forestales. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. <http://www.forest.ula.ve>

31. IPNI. 2007. Nutrición y Fertilización del Banano. Requerimiento nutricional del banano. Internacional Plant Nutrition Institute. <http://www.inpofos.org/>.

32. Jácome, L., and Wshuh. 1992. Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *Difformis*. *Phytopathology* 82 (5): 515-520.

33. Jimenez, M. 2008. Effect of the nutritional status of banana (*Musa* spp.) on leaf disease infestation by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Ecuador. Ph.D thesis. Catholic University of Leuven. Leuven, Belgium. pp51-88.

34. Jones, D. 1991. Status of banana diseases in Australia. In: *Banana Diseases in Asia and the Pacific*. RV. Valmayor (ed.). INIBAP-ASPNET.

Los Baños, Philippines. pp21-37.

35. Jones, D. 1999. Diseases of Banana Abacá and Ensete. Eds. UK. pp6-160.

36. Jones, D. 2000. Introduction to banana, abaca and enset. In: Introduction to banana, Abaca and Ensete. D. Jones (ed.) CAB international. Wallingford, UK. pp1-36.

37. Leonard, K.1984. Populations genetics of gene for gene interaction between plant host resistance and pathogen virulence oxford and IBM. Public. Co. pp131 – 148.

38. López, A., y Espinosa, J. 1995. Manual de nutrición y fertilización del banano. Corporación Bananera Nacional. Estación Experimental La Rita, Pococi – Costa Rica. p3.

39. López, A., y Solís, P. 1992. Síntomas de deficiencias minerales en el

cultivo del banano. I Etapa: Calcio, Magnesio, Zinc y Boro. In: Informe anual Corporación Bananera Nacional S.A. San José, Costa Rica. pp31-32.

40. MAGAP/ SIGAGRO. 2006. Unidad de banano. Quito- Ecuador
<http://www.sica.gov.ec>

41. Magnaye L. 1994. Virus diseases of banana and current studies to eliminate the virus by tissue culture. Proceeding National Symposium on Pests and Diseases of Banana in the Philippines, University of Southern Mindanao, Kabacan, Cotabato. Philippines, pp38-43.

42. Marín, D., y Romero R. 1998. El combate de la Sigatoka negra In: Divulgación científica al servicio del productor bananero nacional. Revista CORBANA. San José, Costa Rica. pp104-129.

43. Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. Second edition. London., UK. Mills, H. A. and J.Benton Jones, Jr. 1996. Analysis handbook II Micro-macro publishing, Inc. USA, p492.

44. Molina y Krausz. 1989. A Phytotoxic activity in extracts of broth cultures of *Mycosphaerella fijiensis* var. *Difformis* and its use to evaluate host resistance to Black Sigatoka. *Plant Disease*. 73:142-143.

45. Mourichon, X., y Fullerton, R. 1990. Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M.fijiensis* Morelet (*C.fijiensis*), respectively, agents of Sigatoka disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. *Fruits* 45: 213-218.

46. Murashige, T., y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.

47. Navarro, G. 2003. Química Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. 2da edición. Publicado por Mundi-Prensa Libros. p487.

48. Okole, B., and Schulz, F. 1997. Selection of *Mycosphaerella fijiensis* -

resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain. *Plant Cell. Reports* 16:339-343.

49. O`Neill et al. 2004. Oramnogalacturonano II. Structure and function of a borate cross-linked cell wall peptic polysaccharide. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55 (1). 109-139.

50. Palacios, M. et al. 2003. La mancha roja del fruto y su relación con los trips. *Boletín Técnico Cenibanano. Medellín, Colombia. No.2.*

51. Pérez, L. 1983. Epifitiología de la mancha de la hoja del plátano (Sigatoka) causada por *Mycosphaerella musicola*. Factores que influyen en el periodo de incubación y el desarrollo de la enfermedad de la mancha de la hoja. <http://bananas.bioversityinternational.org>

52. Quito, D. 2007. Estudio comparativo de dos biofertilizantes líquidos en condiciones in- vitro e invernadero en plantas de banano y su efecto en el desarrollo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Tesis de grado. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción.

Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil-Ecuador. pp97-110.

53. Redondo, M. et al., 2007. El boro (B) y la relación boro-calcio (BCa²⁺).<http://www.uam.es>
54. Ríos, R., & Corella, F.1999. Manejo de la Nutrición y Fertilización del mango en Costa Rica. <http://www.mag.go.cr>
55. Rivas, G., y Rosales, F. 2003. Actas del taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra, nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas", celebrado en Guayaquil, Ecuador. 11- 13 de agosto.
56. Santos, E. 2001. Estudio de la densidad y tamaño de estomas en variedades de (*Musa spp*) con distintos grados de resistencia a Sigatoka negra. Tesis de Ingeniero Agrónomo de la facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. p9 .
57. Simmonds, N. y Shepherd, K. 1955. Taxonomy and origins of cultivated

bananas. London, UK. *Journal of the Linnean Society of Botany* 55:302-312.

58. Song, W. et al. 2008. Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *Int. J. Biol. Sci.* 2008, 4

59. Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., & Sugawara, F. 1992. Analytical methods for phytotoxins. pp. 1-32 in *Methods of plant analysis* (H.F. Linskens & J.F. Jackson, eds). Springer Verlag, Berlin.

60. Stover, R., Simmonds, N. 1987. *Bananas*. 3 ed. Longman, Scientific & Technical. John Wiley & Sons. Inc, New York, p648.

61. Suquilanda, M. 2001. Manejo Alternativo de Sigatoka Negra. Tomado de la Revista *Cultivos Controlados* Volumen 3: (5), mayo 2001. Quito, Ecuador.

62. Upadhyay, R., et al. 1991. Fijiensin, the first phytotoxin from

Mycosphaerella fijiensis the causative agent of black sigatoka disease. *Experientia*. 47:982-984.

63. Vallejo, S. 2002. Perfil del Sector Agropecuario Ecuatoriano 2002. IICA-Ecuador, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. pp1-11.

64. Vovlas, N., y Ekanaiake, H. 1985. Histological Alterations induced by *Rorylenchulus reniformis* alone or simultaneously with *Meloidogyne incognita* on banana roots. *Nematropica* 15:9-17.

65. Walters, D., and Bingham, I. 2007. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens implications for plant disease control. *Annals of Applied Biology* 151(3), 307-324.

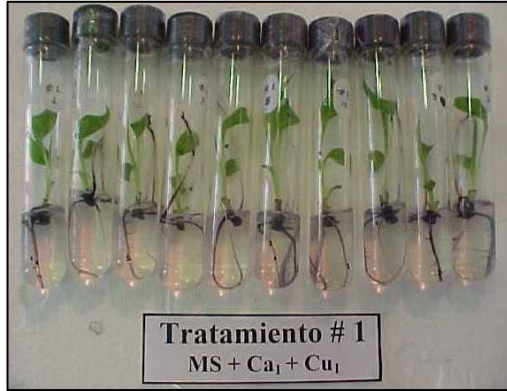
66. Yáñez, J. 2002. Nutrición y regulación del crecimiento en hortalizas y frutales. Efecto de los nutrientes sobre la calidad de los productos y la resistencia físico química de las plantas a plagas, enfermedades y al estrés ambiental. Buenavista- Saltillo-Coahuila. <http://www.uaaan.mx>

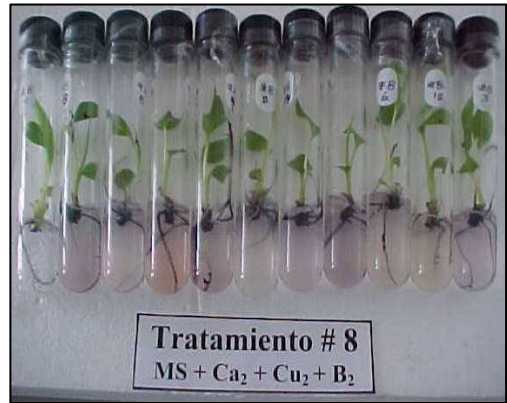
67. Yoder, O. 1980. Toxins in pathogenesis. *Annual. Rev. Plant Pathology.*
18:103-29

APÉNDICES

APÉNDICE A.

DESARROLLO DE LAS PLANTAS IN-VITRO EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.





APÉNDICE B.

SÍNTOMAS CAUSADOS POR INOCULACIÓN CON CONCENTRADO CRUDO TÓXICO DE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS



Tratamiento # 1 Ca_1+Cu_1



Tratamiento # 2 Ca_2+Cu_2



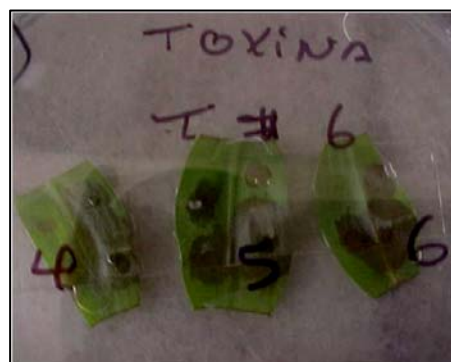
Tratamiento # 3 Ca_1+B_1



Tratamiento # 4 Ca_2+B_2



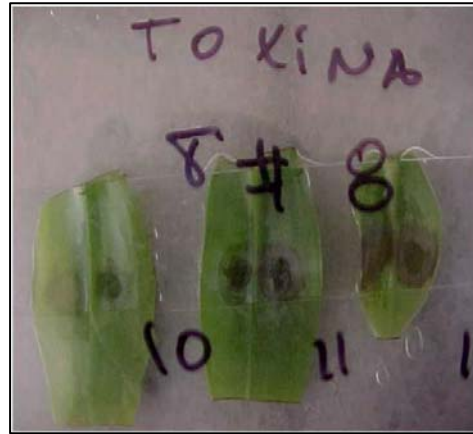
Tratamiento # 5 Cu_1+B_1



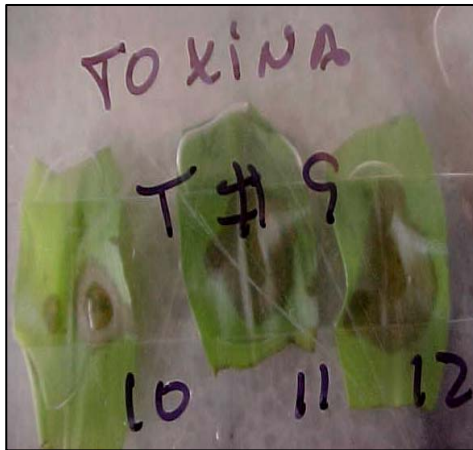
Tratamiento # 6 Cu_2+B_2



Tratamiento # 7 $Cu_1 + Cu_1 + B_1$



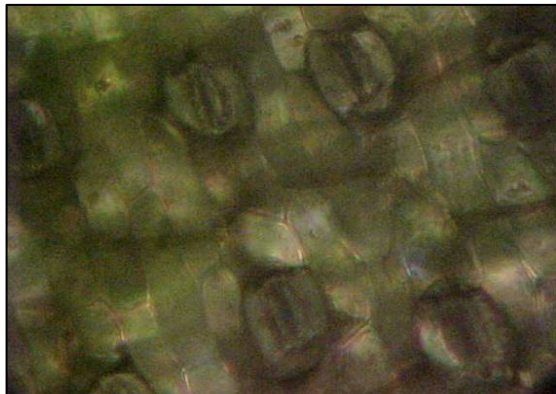
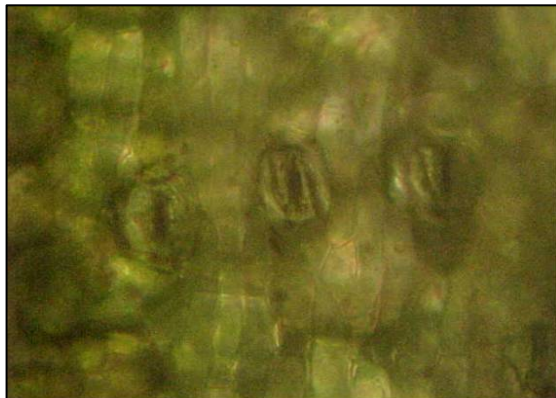
Tratamiento # 8 $Cu_2 + Cu_2 + B_2$



Tratamiento # 9 control
medio MS

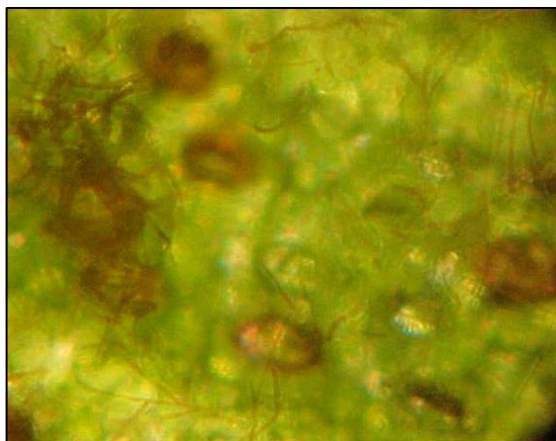
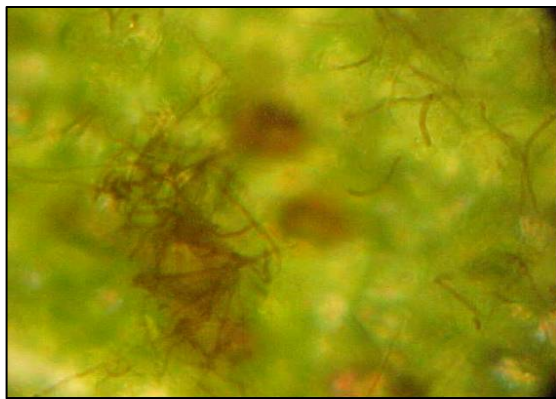
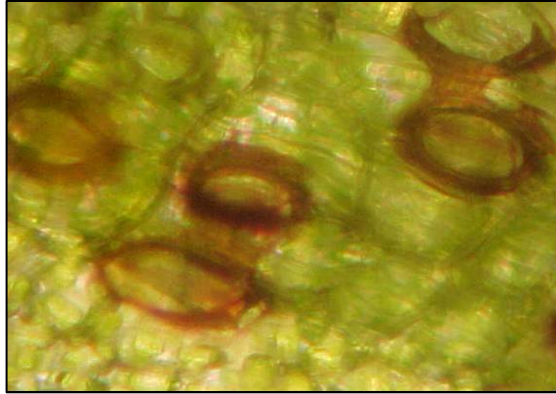
APÉNDICE C.

**DAÑOS CAUSADOS EN EL TEJIDO FOLIAR POR EL CONCENTRADO
CRUDO TOXICO DE *MYCOSPHAERELLA FIJENSIS*.**



APÉNDICE D.

**DAÑOS CAUSADOS EN EL TEJIDO FOLIAR POR INOCULACIÓN CON
CONIDIAS DE *MYCOSPHAERELLA FIJENSIS*.**



APÉNDICE E.

DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS USADOS EN LA INVESTIGACIÓN REALIZADA.

Medio de cultivo PDA

- 200g/l de papa blanca
- 20g/l de dextrosa
- 14g/l de agar
- 1000ml de agua destilada
- pH 5.5-6.5

Medio de cultivo Mycophil

- 200g/l de soya
- 20g/l de dextros
- 14g/l de agar
- 1000ml de agua destilada
- pH 6.5

Tween 20

- 50ul Tween 20
- 100ml de agua destilada

Medio V8

- 200ml de V8
- 16g de agar
- de carbonato de calcio
- 800ml de agua destilada

Proceso de extracción de los Extracto Crudo Toxico de *Mycosphaerella fijiensis*.

- Se preparó medio líquido PDV8
- Luego se esterilizaron los medio líquido en un autoclave a 121°C por 25 minutos
- Después se sembraron colonias del hongo a partir de un cultivo monoascospórico de *Mycosphaerella fijiensis* en cuatro erlermeyer de 1000ml que contenían 600ml de PDV8 estéril.
- También se colocó un medio líquido sin inoculación como testigo del proceso.
- Luego se colocaron los medios líquidos inoculados con *Mycosphaerella fijiensis* en un shaker a 118rpm por el lapso de 30 días.
- Transcurrido el tiempo de incubación se filtraron los medios líquidos a través de ocho gasas estériles.
- Después se les adicionó igual volumen de metanol y se dejaron

incubando a 4 °C por una noche

- Luego se rotovaporaron las muestras a 30 °C, 620mmHg de presión a 90 rpm del cual se obtuvo 1/3 del volumen original
- Después se adicionó igual volumen de Acetato de Etilo y se incubó la muestra en agitación a 118rpm por 24h a temperatura ambiente.
- Transcurrido este tiempo se formaron dos fases que se separaron por decantación y así se obtuvo la primera fracción de Acetato de Etilo.
- La otra fase que quedó se la volvió a rotovaporar a 30 °C, 620mmHg de presión a 90 rpm de la que se obtuvo un 1/3 del volumen original.
- Luego se le adicionó igual volumen de Acetato de Etilo y se incubó la muestra en agitación a 118rpm por 24h a temperatura ambiente.
- Transcurrido este tiempo se formó dos fases que se volvieron a separar por decantación y así se obtuvo la segunda fracción de Acetato de Etilo.
- La otra fase que quedó se la volvió a rotovaporar a 30 °C, 620mmHg de presión a 90 rpm del cual se obtuvo un 1/3 del volumen original
- Luego se le adicionó igual volumen de Acetato de Etilo y se incubó la muestra en agitación a 118rpm por 24h a temperatura ambiente.
- Transcurrido este tiempo se formó dos fases que se separaron por decantación y así se obtuvo la tercera fracción de Acetato de Etilo.
- Una vez obtenidas las tres fracciones se las mezcló y se las rotovaporó hasta obtener una muestra viscosa de aproximadamente 1ml.

- Después se lavó el balón del rotovaporador con 5ml de metanol al 10% y se recogió como dilución de la muestra.

Medio de cultivo PDV8/1litro

- 200gr/l de papa
- 16ml de medio (V8)
- 20gr/l de dextrosa
- pH 6.5

Medio de conservación de tejido

- Se tomo 4gr de agar y se lo disolvió en 1000ml de agua destilada y se adicionó 2ml de benzonidasol.

Preparación del benzonidasol

- Se peso 20mg benzinodasol y se le adicionó 2ml de agua destilada y luego se aplico vortex por 30 segundos para tener una mezcla homogénea. Después esta solución fue filtrada con un filtro Millipore Millar-GV de 0.22µm estéril.

APÉNDICE F.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MEDIO MURASHIGE Y SKOOG

Reactivos	Concentración mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ 7H ₂ O	15.6
ZnSO ₄ 2H ₂ O	8.6
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
Na EDTA	37.3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
Fe EDTA	50
VITAMINAS	
Mio-inositol	100

Ácido Nicotínico	0.5
HCl Piridoxina	0.5
HCl Tiamina	0.1
Sacarosa	3%
pH	5.7

APÉNDICE G.

CONCENTRACIÓN DE LOS TRES ELEMENTOS ESTUDIADOS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

Elementos	Concentración del control (MS) mg/l	Concentración # 1 mg/l	Concentración # 2 mg/l
Ca	119.9	179.8	239.8
Cu	0.00636	0.00954	0.01272
B	1.08	1.62	2.16

APÉNDICE H.

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES QUE CUMPLEN CON LOS SUPUESTOS DEL MODELO ESTADÍSTICO.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ABC_ALT	Factor	12384.443	9	1376.049	3.242	0.001
	Error	59415.245	140	424.395		
	Total	71799.687	149			
ABC_NH	Factor	6629.133	9	736.570	2.623	0.008
	Error	39310.700	140	280.791		
	Total	45939.833	149			
LH	Factor	34.793	9	3.866	3.238	0.001
	Error	167.163	140	1.194		
	Total	201.956	149			
ABC_NR	Factor	64829.300	9	7203.256	2.243	0.023
	Error	449558.533	140	3211.132		
	Total	514387.833	149			
ABC_LR	Factor	381853.516	9	42428.168	3.391	0.001
	Error	1751853.331	140	12513.238		
	Total	2133706.847	149			

APÉNDICE I

AREA BAJO LA CURVA ABC

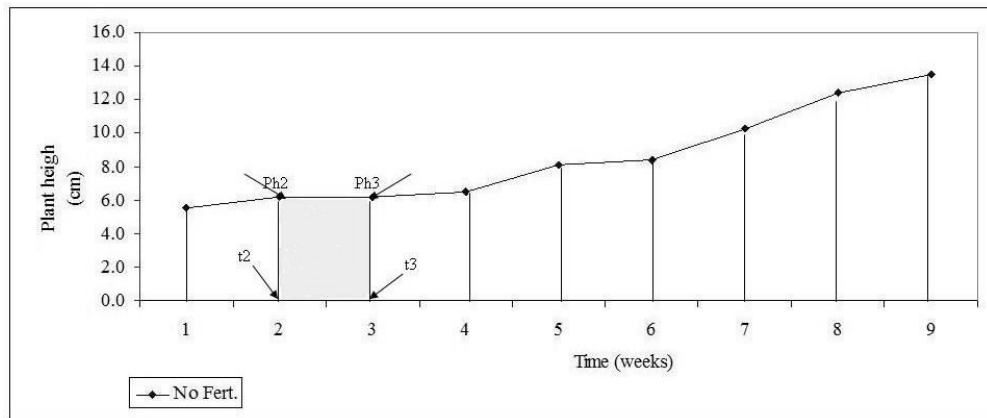
El área bajo una curva (ABC) es un valor matemático calculado para los parámetros medidos a tiempo como el crecimiento de la planta (altura de la planta, número de las hojas, número de las raíces, diámetro de la planta, el etc.) y con la expresión de la enfermedad a tiempo. Este valor representa la cantidad total del parámetro encima del intervalo de evaluaciones de tiempo.

El ABC por cada parámetro y por planta era calculado por la integración trapezoidal descrito por Campbell y Enloquece (1990).

El modelo trapezoidal es el valor del cálculo más simple y común para obtener el ABC..

$$AUC = \sum_{i=1}^{n-1} (X_i + X_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i)$$

Dónde la suma de las áreas es de toda la integración trapezoidal individual de i al $n-1$; n es el número de las evaluaciones, X es el valor de la escala hecha de la enfermedad (síntomas o índice de severidad) o la fecha de crecimiento de planta (altura de la planta, diámetro de planta, número de raíces, número de las hojas, etc.) y el $t_{i+1} - t_i$ - el intervalo de los tiempos entre dos observaciones consecutivas.



Línea de la parcela de altura de la planta versus la presentación de las fechas usados para el cálculo de ABC.

El ABC es calculado por cada segmento. El área de cada segmento se calcula multiplicando el promedio de la altura de la planta (por ejemplo) por la ancho del segmento (días). Para el segmento de Ph2 a Ph3:

$$AUC_{2-3} = \frac{Ph_2 + Ph_3}{2} * (t_3 - t_2)$$

Una vez teniendo el último dato del punto de observación, el ABC es calculado para añadir las áreas juntas.

$$AUC_{1-n} = \left\{ \frac{Ph_1 + Ph_2}{2} * (t_2 - t_1) \right\} + \left\{ \frac{Ph_2 + Ph_3}{2} * (t_3 - t_2) \right\} + \dots$$