



**FACULTAD DE INGENIERIA MECANICA Y CIENCIAS
DE LA PRODUCCION**

PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN AGRICULTURA

INFORME DE PASANTIAS REALIZADAS EN

EL CIBE

TEMA:

Aislamiento Y Conservación del Hongo de la Sigatoka Negra

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE

TECNÓLOGO EN AGRICULTURA

REALIZADO POR:

MONICA MARIANA PARIS MORENO BARZOLA

AÑO - 2005

AGRADECIMIENTO

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. Por haberme permitido obtener conocimiento de los diferentes estudios realizados en uno de los productos de mayor exportación en nuestro país como lo es el Banano



DEDICATORIA

Mis padres

a mi tío

a mi abuelita en especial

Sra. Nieve Macias.



TRIBUNAL DE EVALUACION

DECANO DE LA FIMCP

ING. MARCELO ESPINOSA L.
COORDINADOR DEL PROTAG

ING. MARIO BALON MATA
PROFESOR DELEGADO PROTAG

*Dr. Mario Balon M.
Sup. - Delegado*

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este informe me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”



Mónica M. Paris Moreno B



RESUMEN

La pasantía en práctica, previo al cumplimiento del requisito establecido en el pensum académico del Programa de Tecnología en Agricultura de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, se desarrolló en el área de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, entre los meses de Junio a Noviembre del año 2004. Ejercicio que resumo en el presente informe:

El laboratorio en referencia hace estudios relacionados con la producción de Mycosphaerella fijiensis en las bananeras del Ecuador.

La pasantía permitió entrenamiento en el global y el desarrollo en la tarea de aislamiento y conservación del hongo de la Sigatoka Negra.

Los cinco capítulos de este informe se refieren a la ubicación del problema de las bananeras, caracterización del patógeno en estadio, las técnicas de aislamiento, cultivo in Vitro y conservación de las diferentes cepas capturadas en el litoral ecuatoriano. La importancia de esta investigación es que siendo el banano un cultivo de mucha importancia económica para el Ecuador y específicamente para la costa. Estas plantaciones son diezmadas por el ataque de la enfermedad de la Sigatoka Negra; enfermedad que se presenta en dos fases de reproducción, Mycosphaerella fijiensis fase sexual y

Paracercospora fijiensis fase asexual, sin que hayan variedades satisfactoriamente comerciales, con resistencia a esta enfermedad.

Se hicieron reconocimiento de los síntomas y signos que se presentan con necrosamiento en las hojas, estos se clasifican en seis estadios.

Para el aislamiento del patógeno se tomaron en el campo muestras de hojas enfermas, con estadio entre cuatro y seis; ya que en esta etapa las bolsas periteciales de la hoja se encuentran llenas de ascosporas del hongo.

Las cepas del patógeno fueron aisladas y conservadas para el análisis en sus etapas de agresividad.

Para efectuar esta investigación en el laboratorio se usó material de cristalería limpia y sin estar expuesta al ambiente. Los medios de cultivo fueron esterilizados y los procesos manuales se realizaron en cámara de flujo laminar con máxima asepsia.

Me es grato aportar con mi modesta práctica para conocimiento y análisis de compañeros y profesores interesados en este tema



INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.	VI
INDICE GENERAL.	VIII
INDICE DE FIGURAS.	XII
INTRODUCCION.	XIII

CAPITULO 1

GENERALIDADES DEL BANANO.	15
1.1. Origen.	16
1.2. Características Taxonómicas.	16
1.3. Morfología.	16
1.3.1. Planta.	16
1.3.2. Sistema Radicular.	17
1.3.3. Sistema foliar.	17
1.3.4. Tallo.	19
1.3.5. Las Yemas.	20
1.3.6. Pseudo pecíolo.	21
1.3.7. Vaina.	21
1.3.8. Inflorescencia.	23
1.3.9. Fruto.	23

Etapas de la Enfermedad.	26
2.1.1. <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	26
2.1.2. <i>Paracercospora fijiensis</i>	27
2.2. <i>Síntomas y signos</i>	29
2.2.1. Descripción de los Estadíos.	30
2.3. Perdidas ocasionadas.	35
2.3.1. Impacto Social.	35
2.3.2 Impacto Económico.	37
2.3.3. Impacto Ambiental.	38

CAPITULO 3

AISLAMIENTO DEL PATOGENO EN LABORATORIO.	40
3.1 Selección de Material en Campo.	40
3.2. Selección de Material en el Laboratorio.	40
3.3. Cultivo Monospórico.	43
3.3. Multiplicación del Cultivo.	43



CAPITULO 4

CONSERVACION DE CEPAS DE SIGATOKA NEGRA.	46
4.1. Método de conservación a largo plazo.	47
4.1.1. Conservación por Congelación.....	47
4.1.1.1. Edad de la Célula.....	48
4.1.1.2. Velocidad de la Congelación y Descongelación.....	48
4.1.1.3. Temperatura de Almacenamiento.	49
4.1.1.4. Empleo de Agentes Crioprotectores.	51
4.1.2. Conservación por Liofilización.	51
4.1.2.1. Temperatura Durante la Sublimación.	53
4.1.2.2. Grado de Deshidratación Alcanzado.	53
4.1.2.3. Atmósfera de Oxígeno en el Tubo.	53
4.1.2.4. Condiciones de Almacenamiento.	54
4.2. Métodos Alternativos.	54
4.2.1. Conservación por Transferencia Periódica.	54
4.3. Métodos Restringidos.	56
4.3.1. Desección en Papel Filtro.	56
4.3.2. Desección en suelo, arena, silicagel, etc.....	57

CAPITULO 5

MEDIOS DE CULTIVO.	58
5.1. Preparación de Medios de Cultivo.	58
5.1.1. Medio Agar Agua.	58
5.1.2. Medio Mycophilm.	59
5.1.3. Medio V8.	59
5.1.4 Medio PDA.	60
5.2 Esterilización.	60
5.2.1. En Autoclave.	60
5.2.2. De la Cristalería.	61
5.2.3. Llenado de Cajas Petri con Medio de Cultivo.	61
CONCLUSIONES.	65
RECOMENDACIONES.	66
BIBLIOGRAFIA.	67

INDICE DE FIGURAS

Figura. 2.1. Ciclos de Vida y Fases de reproducción de la planta.	28
Figura. 2.2. Sintomas de la Enfermedad.	29
Figura. 2.2.1. Estadio uno.	32
Figura. 2.2.2. Estadio dos.	32
Figura. 2.2.3. Estadio tres.	33
Figura. 2.2.4. Estadio cuatro.	33
Figura. 2.2.5. Estadio cinco.	34
Figura. 2.2.6. Estadio seis.	34
Figura. 3.1. Selección de Area esporulante.	42
Figura. 3.2. Discos para Descarga.	42
Figura. 3.3. Cámara Húmeda.	42
Figura. 3.4. Descarga de Ascosporas.	42
Figura. 3.5. Colonia del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	44
Figura. 3.6. Cámara de Flujo Laminar.	45
Figura. 3.7. Hemacitómetro.	45
Figura. 4.1. Armario de Congelación -80 °C.	50
Figura. 5.1. Hot Plate (Plato calentador y agitador.)	62
Figura. 5.2. Preparación de Medios de Cultivo.	63
Figura. 5.3. Autoclave.	63
Figura. 5.4. Estufa.	64

INTRODUCCION

El banano es uno de los cultivos de mayor exportación y la mayor fuente de ingreso económico en nuestro país, ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en volumen de producción y consumo después del arroz, el trigo y la leche.

En el año de 1977 el Ecuador exportaba una cantidad de 4.200 toneladas métricas de fruta en 210'000.000 millones de cajas con ingresos de 1300'000.000 de dólares en divisas y una superficie sembrada de 130.000 Ha. (Walter Espurrier Baquerizo 1998).

Pero, en la actualidad este hectareaaje de banano se ve afectado por una enfermedad que es de caracterización agresiva conocida como, Sigatoka Negra, (Mycosphaerella fijiensis. Mor.) la cual es causante de la baja Producción y rendimiento de la fruta. Esta enfermedad ha causado considerables perjuicios, ya que la infección en la planta da como resultado una merma del 40 % en el costo total de producción en el banano.

La Sigatoka Negra es combatida químicamente con la aplicación de fungicidas, sin embargo este método es nocivo para el medio ambiente y su población.

Por este motivo muchos centros e instituciones de investigación han colocado sus expectativas en el estudio e investigación de Musas resistentes a la Sigatoka Negra.

El CIBE permanece en constante trabajo de la mano con todas sus áreas, realizando paso a paso sus estudios para obtener la variedad o variedades que sean resistentes a esta enfermedad y así brindar servicio y ayuda al sector bananero.

El área de Fitopatología es la encargada de estudiar y realizar ensayos en plantas infectadas para observar la evolución que tiene el patógeno tanto en el campo como de manera in Vitro.

El aislamiento y conservación del hongo es realizada para obtener conidias frescas y poder almacenarlas para estudios posteriores en el laboratorio.

En esta área fue donde realice mis pasantías, y participe en actividades de aislamiento y conservación de conidias antes ya mencionadas para los distintos estudios que se efectúan.

El siguiente reporte es una recopilación de metodologías y lecturas citadas que me sirvieron de guía para conocimiento y desarrollo propio en las actividades que se me asignaban en dicha área.

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES DEL BANANO.

El banano es una planta perteneciente a la familia de las Musáceas su nombre científico, Musa paradisiaca este es uno de los cultivos mas utilizados en el mundo; después de los cítricos es la fruta mas importante en América.

Es de fácil propagación, es encontrada en más de 120 países.

La primera clasificación científica del banano fue hecho por Linnaeus en 1783. El dio el nombre de *Musa sapientum* a todos los bananos de postre, los cuales son dulces cuando maduran y pueden comerse crudos. El nombre *Musa paradisiaca* fue dado al grupo de los plátanos los cuales son cocinados y consumidos cuando aun están verdes estos poseen un alto contenido de almidón.

1.1. Origen.

Es originario de Asia meridional, conocido en el Mediterráneo desde el año 650. Llegó a Canarias en el siglo XV y desde allí fue llevado a América en el año 1516. El cultivo comercial se inicio en Canarias a finales del siglo XIX y principios del siglo XX.

1.2. Características Taxonómicas.

El banano pertenece a la Clase Monocotiledónea, Orden Estaminales, Fam. Musáceos, sub. Familia Musoidea, Género Musa. Serie Eumusa, Especies (cruces interespecificos) *M acuminata* * *M balbisiana*. Sub Grupo plátano. Variedades cuernos (AAA) (AAB)

1.3. Morfología.

1.3.1. Planta.

Herbácea perenne gigante, con rizoma corto y tallo aparente, que resulta de la unión de las vainas florales, cónico y de 3.7-7.5 m de altura, terminado en una corona de hojas.

1.3.2. Sistema Radicular.

Conformado por raíces netamente adventicias fasciculadas y fibrosas, que se originan en el ámbito de la capa magín, se distinguen tres tipos: Primarias, secundarias y terciarias.

El color depende de la edad y etapa de desarrollo, pueden variar de blanco cremoso a pardo amarillento; de edad avanzada tienen una coloración castaño oscuro.

La longitud radicular, está influenciada por la textura y estructura del suelo, en los livianos a francos, la longitud puede alcanzar los tres y en suelos pesados dos metros. En cuanto al diámetro en el punto de unión con el rizoma puede variar de 0.4 a 1.00 m en suelos livianos. La media de producción de raíces está alrededor de 200 raíces por planta.

1.3.3. Sistema Foliar.

Formado por el apéndice, seudo pecíolo y vaina o hijuelos.



Apéndice.

Órgano foliar temporal, su función es la de dirigir la hoja a través y hasta el ápice del pseudotallo. Una vez que la hoja alcanza su desarrollo completo se seca y desprende.

Limbo.

La lámina foliar está compuesta por los dos semi limbos, la nervadura central, nervaduras laterales y finalmente las bandas denominadas como pulvinares.

La lámina foliar posee una forma ovalada, con su extremo apical romo o cónico y el basal acanalado, el desarrollo de los lóbulos en la parte basal de cada semi limbo es simétrico hasta que se presenta la diferenciación floral, de ahí en adelante simétrico hasta el punto de que uno de ellos puede ser más redondeado que el otro. El color bajo condiciones normales es verde oscuro en el haz y verde claro en el envés, lugar donde registra mayor número de estomas en proporción de 4:1 por mm². El tamaño puede variar de un mínimo 21.3 * 1.6 cm. para la hoja # 1 a un máximo 2.58 * 0.87 para la hoja 32. La hoja adquiere su tamaño y forma antes de emerger del pseudotallo, pero cuando se presenta lo hace de manera enrollada. La emergencia de la hoja, varía de acuerdo a las condiciones ambientales, en general dura

unos nueve días. El factor que puede incrementar este periodo es la sequía hasta en más de 15 días.

En cuanto al número de hojas emitidas durante el ciclo vegetativo puede ser de 38 ± 2 con una emisión foliar de 9.12 días por hoja. La duración de la fase de emisión foliar varía entre 10.9 y 12.2 meses.

Las bandas pulvinares localizadas en el punto de unión de los limbos con la nervadura central, son estructuras sólidas, estrecha fácilmente diferenciables por su color amarillo, funciona bajo condiciones favorables de precipitación, luz y temperatura, los semi limbos permanecen abiertos, pero si se registra una sequía o días de excesiva radiación solar y temperatura alta, los semilimbos se pliegan hacia la parte inferior reduciendo parcialmente la transpiración.

1.3.4. Tallo.

El verdadero tallo es un rizoma grande, almidonoso, subterráneo, que está coronado con yemas; estas se desarrollan una vez que la planta ha florecido y fructificado. A medida que cada chupón del rizoma alcanza la madurez, su yema terminal se convierte en una inflorescencia al ser empujada hacia arriba desde el



interior del suelo por el alargamiento del tallo, hasta que emerge arriba del pseudotallo.

1.3.5. Las Yemas.

Dan origen a los "hijuelos de espada o de agua", tienen su origen en la zona interna o central y emergen a la superficie del corno por la base del entrenudo. Su posición queda en estrecha relación con la distribución.

En un principio el crecimiento y desarrollo de las yemas respecto al eje del tallo es perpendicular pero luego se torna paralelo. Su emergencia sobre la superficie del suelo está condicionada principalmente por la densidad poblacional y la edad del tallo cuando se trata de poblaciones establecidas y en siembras nuevas por el tamaño del corno.

La emergencia de las yemas se lleva a cabo a cuatro o cinco meses después de la siembra, durante esta etapa poseen un tallo pequeño y sistema radicular propio, produce únicamente vainas foliares. A partir del corte o separación de la planta madre cesa el efecto de dominancia apical e inicia a emitir hojas de limbos anchos.

Generalmente se cree que los hijos de agua, deben eliminarse, durante las podas de selección, pero si se separan de la madre y se siembran en sitios independientes dan origen a plantas que se desarrollan normalmente y producen racimos de optima calidad.

1.3.6. Pseudo peciolo.

Es la porción de la hoja que une la vaina con la nervadura central formada por un acortamiento gradual de la porción superior de la vaina. Esto explica por qué es una estructura redondeada, por debajo y acanalada para permitir la divergencia de las láminas foliares.

1.3.7. Vaina.

Estructura foliar, tiene su origen en la túnica meristemática apical del tallo subterráneo, el cual posteriormente redondeado tanto en los nudos de su porción subterránea como el de la aérea; de superficies interna y externa, lisos y brillantes, de forma de trapecio regular y sus dimensiones varían de acuerdo al estado nutricional de la planta. En plantas recién cosechadas, ésta estructuras en las ultimas 15 hojas emitidas, registro

un promedio de las siguientes dimensiones: altura 0.7 a 4 m y el ancho superior e inferior de 9.49 a 17.0 cm. y de 20.4 a 74.50 respectivamente. Al hacer un corte transversal del seudotallo a un metro sobre la superficie del suelo, se puede apreciar que cada vaina, en cuanto a su grosor, posee la forma de media luna, de bordes delgados y centro de mayor espesor, alcanza una media de 19.5 cm.

Las vainas dan origen una estructura erecta de forma cilíndrica denominada seudotallo cuya función soporte del sistema foliar, el tallo y la inflorescencia.

En el seudotallo se puede apreciar que las vainas circundan al tallo en pares opuestos, en los extremos del primer par se presentan una superposición, a partir del segundo solo uno de los extremos puede superponerse a otros. De acuerdo con esto, el eje de cada par se desplaza en relación con el anterior en sentido opuesto a las manecillas del reloj, así dan origen a la distribución helicoidal del sistema foliar.



1.3.8. Inflorescencia.

Flores amarillentas, irregulares y con seis estambres, de los cuales uno es estéril, reducido a estaminodio petaloideo. El gineceo tiene tres pistilos, con ovario ínfero. El conjunto de la inflorescencia constituye el "régimen" de la platanera. Cada grupo de flores reunidas en cada bráctea forma una reunión de frutos llamada "mano" que contiene de 3 a 20 frutos. Un régimen no puede llevar más de 4 manos excepto en las variedades muy fructíferas, que pueden contar con 12-14.

1.3.9. Fruto.

Oblongo, durante el desarrollo del fruto éstos se doblan geotrópicamente, según el peso de éste, hace que el pedúnculo se doble, Esta reacción determina la forma del racimo. Los plátanos son polimórficos, pudiendo contener de 5 - 20 manos, cada una con 2 - 20 frutos, siendo de color amarillo verdoso, amarillo, amarillo - rojizo o rojo.

Los plátanos comestibles son de partenocarpía vegetativa, o sea, que desarrollan una masa de pulpa comestible. La partenocarpía y la esterilidad son



mecanismos diferentes, debido a cambios genéticos, que cuando menos son parcialmente independientes.

La mayoría de los frutos de la familia de las Musáceas comestibles son estériles, debido a un complejo de causas, entre otras, a genes específicos de esterilidad femenina, triploidía y cambios estructurales cromosómicos, en distintos grados.





CAPITULO 2

SIGATOKA NEGRA.

Las enfermedades son los factores más importantes en la producción del banano alrededor del mundo. Estas son las razones por las cuales los programas de reproducción y fitomejoramiento fueron creados. Recientemente, las enfermedades se convirtieron en blanco principal de los esfuerzos biotecnológicos para mejorar este cultivo.

La enfermedad de la mancha de la hoja, la Sigatoka negra, es la más importante de estos problemas. Causa una reducción significativa en el área fotosintética de la hoja, pérdidas en el rendimiento de hasta el 50%, y madurez prematura, un defecto muy serio de la fruta para exportación. La Sigatoka negra causa más daños, es más difícil de controlar que la Sigatoka amarilla.

La Sigatoka negra fue identificada por primera vez en el valle de Sigatoka en Fiji, en 1963, pero probablemente, en ese entonces, ya

estaba distribuida a lo largo y ancho del sudeste de Asia y el Pacífico sur. En el hemisferio occidental, apareció en 1972 en Honduras, y ahora está presente desde la parte central de México, hacia el sur hasta Bolívar y la parte noroccidental de Brasil, y en el Caribe (Cuba, Jamaica, República Dominicana y el sur de Florida). En África fue registrada, en 1973, y desde entonces, se ha expandido hacia los territorios bajo el Sahara. En la mayoría de las áreas, la Sigatoka negra ha reemplazado a la amarilla, para convertirse en la enfermedad predominante del banano.

2.1. Fases de la Enfermedad.

La Sigatoka negra es causada por el hongo Mycosphaerella fijiensis Morelet (fase sexual) o Paracercospora fijiensis (Morelet) Deighton (fase asexual). Estas fases se caracterizan por: (Figura 2.2.1.)

2.1.1. Mycosphaerella fijiensis (Pons, 1987 y González, 1988):

En esta fase el hongo forma una estructura denominada peritecio, el cual es globoso, de color marrón oscuro y de 47 – 85 micras de diámetro. La parte superior del peritecio presenta apertura denominada ostiolo. Dentro del peritecio se encuentran las ascas que son especie de saco, en cuyo

interior se encuentran las Ascosporas, las Ascosporas son hialinas, fusiformes bicelulares de 12.5 a 16.5 micras de largo y de 2.5 a 3.8 micras de ancho.

2.1.2. Paracercospora fijiensis (González, 1988; Pons, 1989; Pineda y Carrasco, 1995):

En esta fase el hongo forma, a veces, una agrupación de células irregulares de color marrón olivácea, denominado estoma. A partir de células del estroma se forman dos o más conidioforos cilíndricos, rectos o curvos; de color marrón oliváceo, septados, 25 micras de largo y 3 a 4 micras de ancho. Los conidioforos también pueden formarse en forma solitaria y en ausencia de estroma o en grupos de 2 a 8 unidades. Sobre los conidioforos se forman células conidiogenas, cilíndricas, rectas o curvas, de color marrón oliváceo, de 25 micras de largo y 3 a 4 de ancho. A partir de las células conidiogenas se originan los conidios subhialinos, septado, de 20 a 132 micras de largo y 1.5 a 20 micras de ancho. Cuando los conidios están maduros, se desprenden, quedando una cicatriz moderadamente visible en la célula conidiogena y otra en la base del conidio.



2.2. Síntomas Y Signos.

Los primeros síntomas de la enfermedad de Sigatoka negra son manchas cloróticas muy pequeñas que aparecen en la superficie inferior de la tercera o cuarta hoja abierta. Las manchas crecen convirtiéndose en rayas de color marrón delimitadas por las nervaduras. (Figura 2.2.).

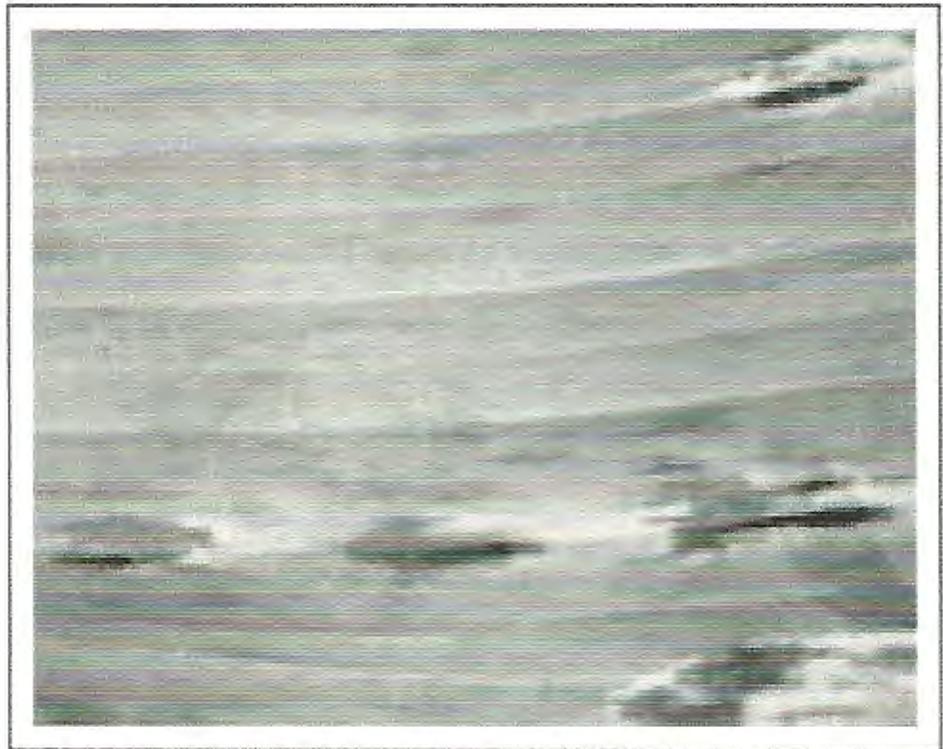


Figura. 2.2. Síntoma de la enfermedad

El color de las rayas va haciéndose más oscuro, algunas veces con un matiz púrpura, y visible en la superficie superior. Luego las lesiones se amplían, tornándose fusiformes o elípticas, y se

oscurecen aún mas formando las rayas negras de las hojas características de la enfermedad.

El tejido adyacente frecuentemente tiene una apariencia como empapado o mojado, especialmente cuando está bajo condiciones de alta humedad.

Cuando el grado de severidad de la enfermedad es alto, grandes áreas de la hoja pueden ennegrecer y lucir empapadas. En el tejido necrótico numerosos cuerpos de fructificación (pseudotecios), diminutos, negros y globosos que contienen estructuras como sacos o bolsas (ascas) llenos de ascosporas van a emerger de la base de la hoja.



2.2.1. Descripción de los Estadios.

Estos síntomas pueden ser descritos en seis estadios los cuales revisaremos a continuación.

1.- Formación de pequeños puntos descoloridos en la parte inferior de la hoja. (Fig. 2.2.1.)

2.- Transformación de puntos en pequeñas estrias de color café. (Fig. 2.2.2.)

3.- Estos puntos se convierten en estrías que crecen tanto a lo largo como a lo ancho. (Fig. 2.2.3.).

4.- Cambian la coloración de las estrías de color café a negro. (Fig. 2.2.4.).

5.- Formación de halo clorótico alrededor de las lesiones. (Fig. 2.2.5.).

6.- Después de la unión de las lesiones, se paraliza el crecimiento y éstas se secan, verificándose en ellas puntuaciones oscuras pequeñas que son fructificaciones del patógeno. (Fig. 2.2.6.).

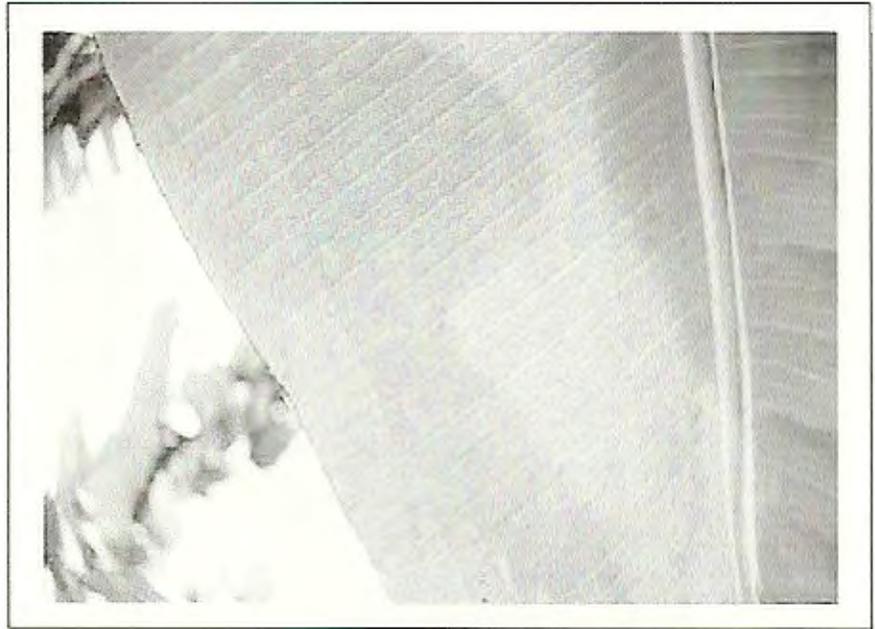


Figura. 2.2.1. Estadio uno

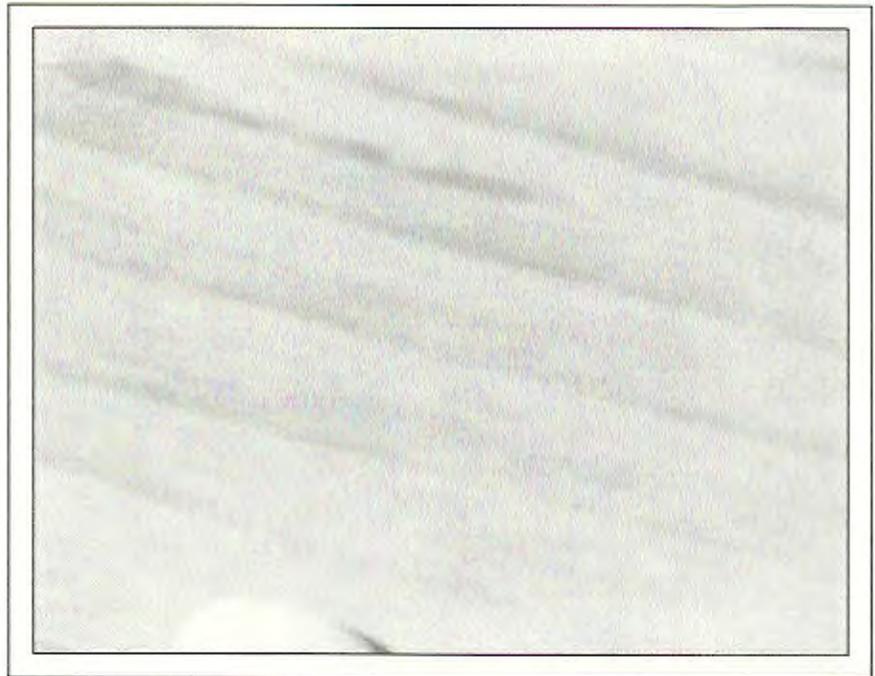


Figura. 2.2.2. Estadio dos



Figura. 2.2.3. Estadio tres.

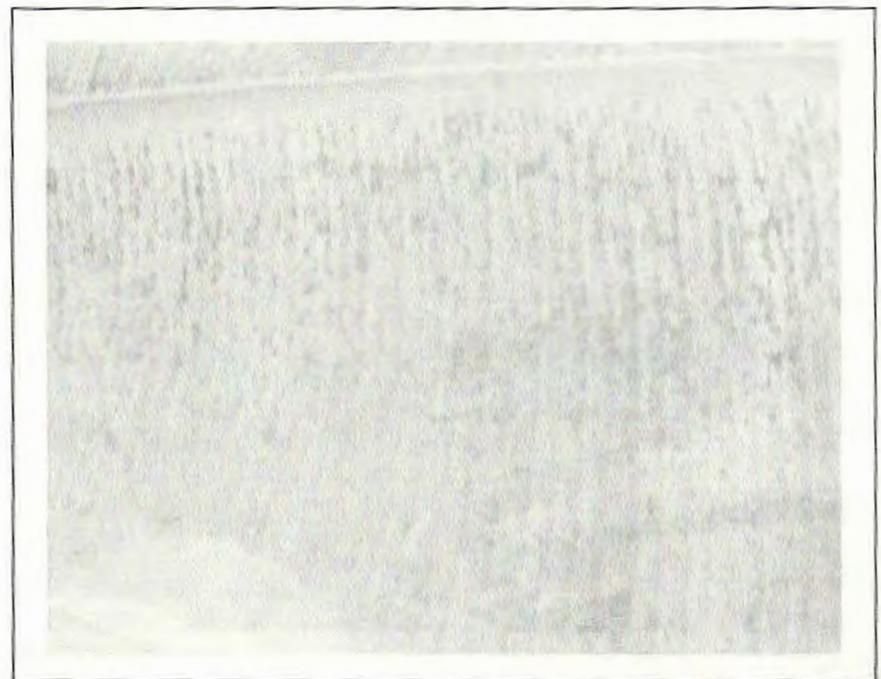


Figura. 2.2.4. Estadio cuatro.



Figura. 2.2.5. Estadio cinco.

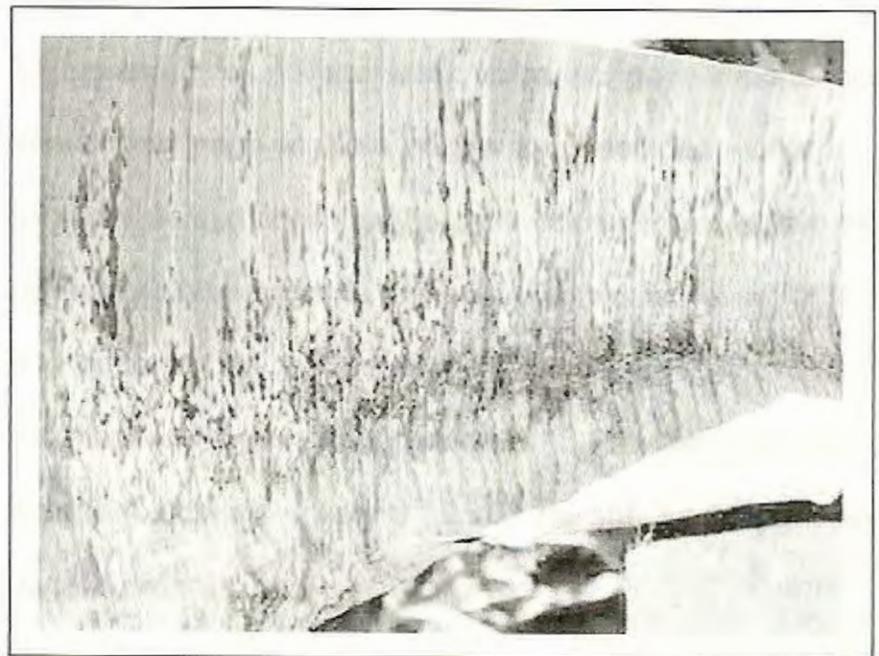


Figura. 2.2.6. Estadio seis.

2.3. Pérdidas Ocasionadas.

La Sigatoka Negra es más destructiva que la Sigatoka Amarilla. Las manchas en Sigatoka Negra aparecen más temprano, hasta en hoja 3- 4 y 6. Las estrias aparecen de 10 a 14 días más temprano que en Sigatoka común y el período de transición es de 6 a 7 días más temprano.

Las pérdidas a causa de esta enfermedad pueden ser totales, si en las épocas de mayor incidencia se retrasan los ciclos de aspersión por dos o más semanas (Haddad et al., 1989; Hernández y Ordosgoitti, 1996).

2.3.1. Impacto Social.

El banano y el plátano son rubros de gran importancia económica para el país, estos considerados como un alimento de alto consumo. La producción de este cultivo es destinado de la siguiente manera: al consumo fresco (90%), a la industria (1%) y la exportación (menos del 10%).

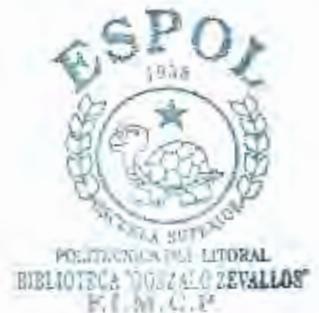
Los bananos y plátanos aportan un 45,11% del valor de la producción de las frutas y el 10.32% del sub- sector agrícola vegetal del país.

La Sigatoka Negra es la enfermedad que mayores pérdidas causa en las plantaciones comerciales de plátanos y

bananos, debido a la severidad de infección al follaje, el cual queda totalmente quemado e inservible para los procesos fotosintéticos, provocando al final una baja producción y racimos de mala calidad, lo cual estará directamente relacionado con una reducción en la superficie sembrada, aumento en la tasa de desempleo y sustitución de rubro. (Lehmann, 1984; Hernández y Ordosgoitti, 1996).

En países vecinos los pequeños productores se han visto afectados, planteándose la alternativa de sustituir este cultivo con otros como son: yuca, cítricos, aguacate, caña de azúcar, lechosa, otros.

El hombre es el agente responsable de la dispersión y entrada de este hongo en América. Podemos decir que puede ser un elemento diseminante por las siguientes consecuencias: introducción ilegal y sin cuarentena de partes vegetales, falta de precauciones necesarias por parte de visitantes o zonas infectadas, medios de transporte (especialmente internacionales), y falta de rigurosos controles en puertos y aeropuertos.



2.3.2. Impacto Económico.

La Sigatoka Negra es la enfermedad que más amenaza a la industria bananera en el mundo después del Mal de Panamá, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* E. F.S. Sny & Hans, ésta es mucho más virulenta que la Sigatoka Amarilla y su control es considerablemente más difícil. La mayor producción de ascosporas, así como la mayor esporulación por el envés de la hoja y el patrón de infección a lo largo de la vena central, dificulta su control y lo hacen altamente costoso. Los fungicidas empleados para la Sigatoka Amarilla también son aplicables para controlar la Sigatoka Negra pero los ciclos de aspersión deben ser mucho más cortos y en dosis más elevadas que pueden ir de 1.5 a 2 veces más y 2.5 a 3.5 veces más ciclos por año (Haddad et al. , 1982; Hernández y Ordosgoitti, 1996).

La Sigatoka Negra causa cuantiosas pérdidas al disminuir notoriamente la capacidad productiva de las plantaciones. Cuando no se controla adecuadamente, puede provocar la pérdida total de las mismas. En Honduras (1976) causó, una reducción de 85% en el número de cajas exportadas de plátano.

En los países productores de banano, su incidencia origina considerables gastos de fungicida y maquinaria para su aplicación, el costo para su control es cuatro veces superior al de la Sigatoka Amarilla y se requieren de 33 a 36 o más aplicaciones de fungicida por año y para lograr cierta efectividad; Los programas de control de Sigatoka Negra basados en la aplicación de fungicidas deben repetirse indefinidamente todos los años a costos cada vez mayores. La medida más sostenible de control es el manejo integrado (Stover, 1976; Romero y Cubero, 1987).

2.3.3. Impacto Ambiental.

Actualmente, el control de la Sigatoka Negra se ha orientado al control químico, lo cual involucra el uso indiscriminado de productos tóxicos y efectos residuales en el medio ambiente (suelo y aguas) el cual contempla un mínimo de 12 aplicaciones por ciclo de producción sin la debida asistencia técnica por parte de los organismos oficiales por la escasez de personal y recursos económicos por la que atraviesan estos organismos. Esto ha traído como consecuencias grandes pérdidas económicas por los elevados costos que representan los productos y el exceso que se aplica de los



mismos. Esto puede generar la aparición de razas resistentes de este patógeno sino se toman las medidas pertinentes (Stover, 1976 y 1977).



CAPITULO 3

AISLAMIENTO DEL PATÓGENO EN LABORATORIO.

3.1. Selección de Material en el Campo.

Se recolectan las hojas más jóvenes con tejido necrótico. La recolección es realizada preferiblemente de 2 a 3 días después de haberse presentado las lluvias, así se asegura la presencia del inóculo en el tejido foliar. Las partes más secas de la hoja que se tornan de color blanco-grisáceo producen mayor cantidad de ascosporas, estas muestras son colocadas en una funda de papel y llevadas al laboratorio.

3.2. Selección de Material en el Laboratorio.

Al llegar las muestras seleccionadas se procede a revisarlas con la ayuda del microscopio (Fig. 3.1.), y recortar en pequeños cuadros en los cuales haya presencia de peritecios llenos de ascosporas. Luego se procede a grapar estos pequeños cuadros de tejido enfermo en discos de papel filtro, las muestras deben ser grapadas

poniendo de frente el envés de la hoja estos discos deben tener un tamaño un poco más grande que una caja Petri. (Fig. 3.2.)

En un recipiente plástico se coloca algodón en la base formando una especie de cama, y se coloca agua destilada pero solo tratando de humedecer el algodón, los discos son puestos en este envase plástico y se los cierra herméticamente para proceder a llevarlos a un lugar donde no pase de los 26 °C por 48 horas. (Fig. 3.3.)

Pasadas las 48 horas se sacan los discos y se procede a colocarlos en medio Agar Agua, los discos deben ser colocados en la tapa de la caja petri con las muestras de tejido enfermo de frente al medio de cultivo, Estos discos son colocados por 2 horas ya que es el tiempo determinado para que bajen las ascosporas a obtener alimento.

(Fig. 3.4.)

Aislamiento de *Mycosphaerella fijiensis*



Figura. 3.1. Selección de Área Esporulante.



Figura. 3.2. Discos de Descarga.



Figura. 3.3. Cámara Húmeda



Figura. 3.4. Descarga de ascosporas.



3.3. Cultivo Monospórico.

En cada caja de Petri con agar al 4%, se localizan las zonas de descarga de ascosporas mediante un microscopio con aumento de 4X. Para la identificación de las ascosporas se utiliza el microscopio con aumento de 20X. Las ascosporas tienen forma de huella, y son biseladas, con una longitud aproximada 18- 19 μ (Fig. 3.4.).

Con la ayuda de un estereoscopio y una asa fina, se extrae una ascospora y se coloca en una caja de Petri, al cual se le ha agregado el medio de cultivo (10 ml) a base de PDA (papa dextrosa agar), son colocadas hay hasta su crecimiento, deben permanecer por 8 días en la incubadora a 26 °C .

Luego de 8 días el hongo ya ha crecido (Fig. 3.5.) y esta listo para pasarlo al medio Mycophilm este medio permanece de 20 a 22 días a una temperatura de 26°C en oscuridad (Incubadora). Esta actividad debe ser realizada en una cámara de flujo laminar debidamente esterilizada. (Fig. 3.6.).

3.4. Multiplicación del Hongo.

Luego de 22 días aproximadamente, se cortan trozos pequeños de la masa de micelio, los cuales se colocan en una solución de Agua Tween al 0.0005% se lo mezcla (vortex), con la ayuda de una pipeta se toman 1.8 ml y se lo inocula en cajas de Petri con medio (V-8),

(antes de ser inoculadas las cajas se toman 22 microlitros de la suspensión antes mencionada y con la ayuda de un microscopio y un hemacitómetro se hace un conteo para calcular la concentración de conidios), estas cajas serán incubadas por 8 días a una temperatura de 26°C y luz fluorescente. (Fig. 3.7.)

Para el mantenimiento de las cepas es recomendable repetir este procedimiento cada 22 días. Todo el proceso se realiza en una cámara de flujo laminar.

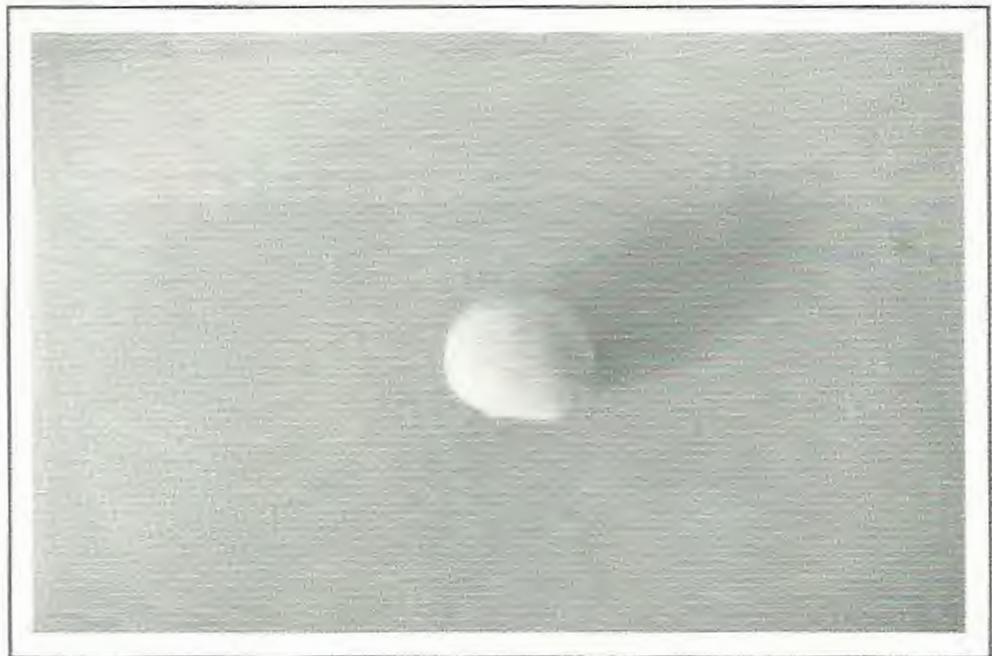


Figura. 3.5. Colonia de *Mycosphaerella fijiensis*

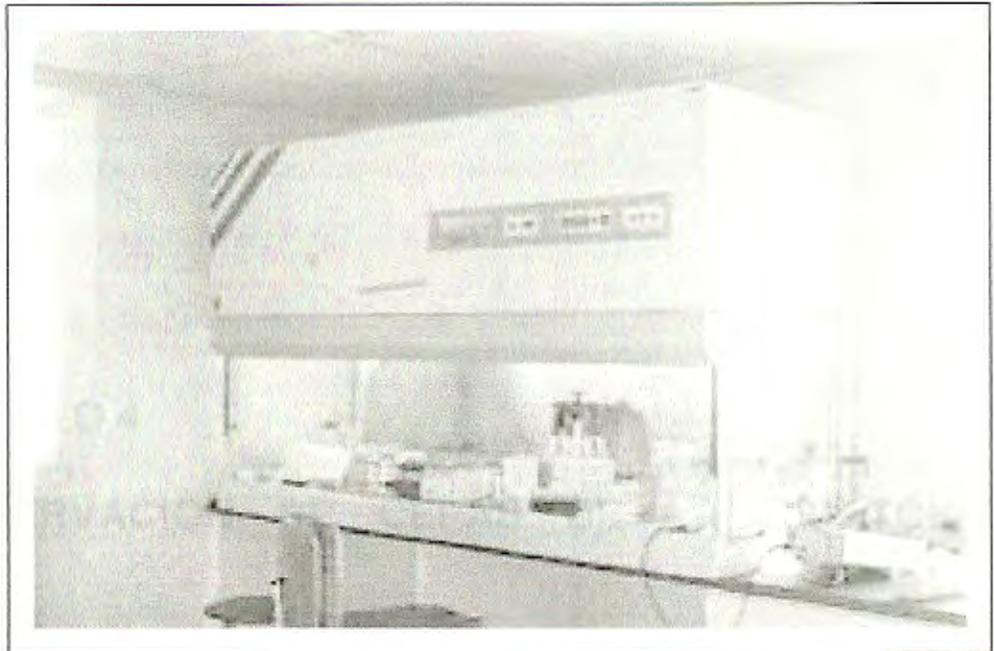


Figura. 3.6. Cámara de Flujo Laminar.

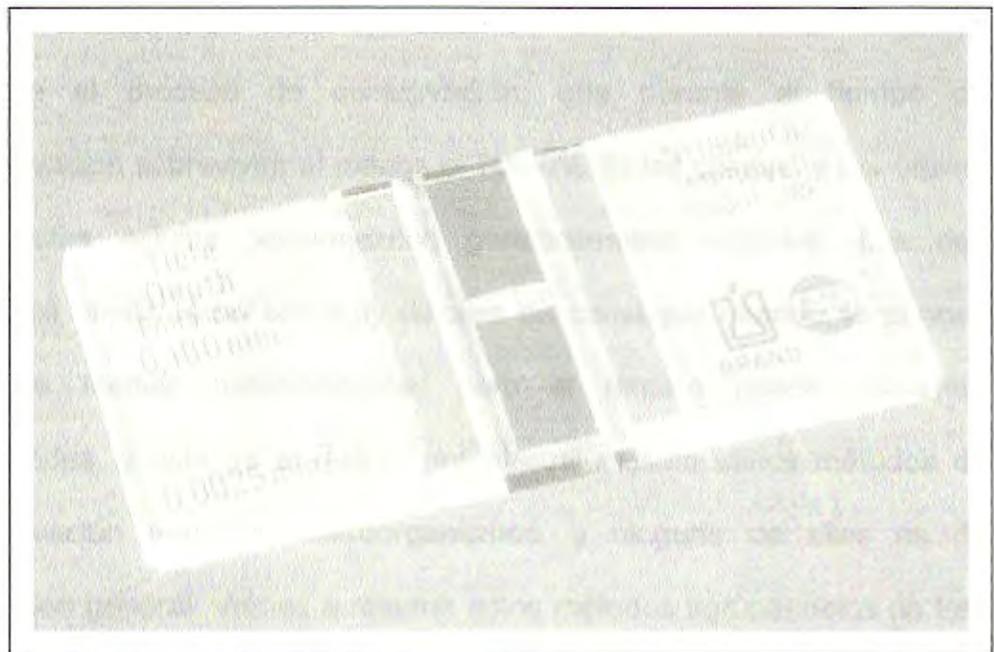


Figura. 3.7. Hemacitómetro (Cámara de Neubauer).

CAPITULO 4

CONSERVACIÓN DE CEPAS DE LA SIGATOKA NEGRA

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Los dos primeros objetivos no son muy difíciles de conseguir cuando se conoce bien la técnica microbiológica, pero el tercero puede presentar dificultades, y este es el motivo por el cual existen varios métodos de conservación para los microorganismos, y ninguno de ellos es de utilización general. Vamos a resumir estos métodos agrupándolos en tres apartados, que son: Métodos de elección o de conservación a largo plazo, métodos alternativos y métodos restringidos.

4.1. Métodos de conservación a largo plazo.

Este método es considerado como muy bueno ya que paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Aún así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en si mismo. Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo son dos: Congelación y liofilización.

4.1.1. Conservación por congelación.

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También



resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas. Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

4.1.1.1. Edad de las células:

En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.

4.1.1.2. Velocidad en la congelación y descongelación:

Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37°C.

4.1.1.3. Temperatura de almacenamiento:

Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C , o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C .

En el mercado existen variados tipos de armarios congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70°C .

(Fig. 4.1)

Aquellos que sólo alcanzan temperaturas entre -20°C y -40°C , como ocurre con la mayoría, no son aconsejables, entre otras cosas porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si se añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo el glicerol, se reduce la

cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica.

Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión.

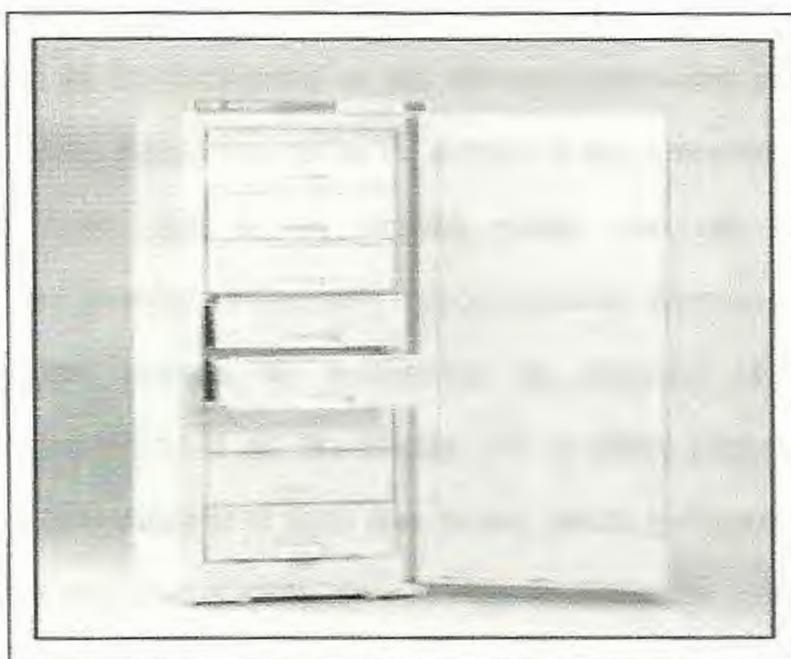


Figura. 4.1. Armario de Congelación-80° C.

4.1.1.4. Empleo de agentes crioprotectores:

Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se utiliza Tween 20 en concentraciones de 10 - 15 y 30%.

4.1.2. Conservación por liofilización.

Tampoco se da crecimiento en las células conservadas por este método, puesto que se les ha quitado el agua mediante la liofilización, que es un proceso suave. Con ello la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células. Por lo tanto, primero tenemos que congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura, lo que acabaría afectando a la viabilidad del microorganismo. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores, de los que hay muchos modelos en el mercado. Las células microbianas así conservadas se someten a un tratamiento más complejo que en el caso de la

del agua puede dañar a las células microbianas. Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores la leche descremada para hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos pueden ser más convenientes otros crioprotectores.

Los nuevos factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

4.1.2.1. Temperatura durante la sublimación.

Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C .

4.1.2.2. Grado de deshidratación alcanzado.

Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.

4.1.2.3. Atmósfera de oxígeno en el tubo.

Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la

presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.

4.1.2.4. Condiciones de almacenamiento.

La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C. Los liófilos se deben guardar en la oscuridad.

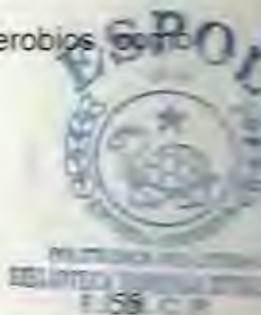
4.2. Métodos alternativos.

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, bien por carecer de los equipos necesarios, o bien porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos.

4.2.1. Conservación por transferencia periódica.

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del

metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco. Este es el peor método para conseguir la estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características. Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los periodos entre dos resiembras. Esto se puede conseguir de varias maneras como por ejemplo disminuyendo la cantidad de inóculo; rebajando la proporción de algunos nutrientes en el medio de cultivo; inoculando en picadura los microorganismos que son anaerobios facultativos, ya que el crecimiento en presencia de oxígeno es más rápido y origina productos generalmente tóxicos; y almacenando los cultivos a 4°C-8°C. A veces también se suele recubrir el crecimiento con una capa de aceite mineral estéril. Con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración. Hay que tener en cuenta que los microorganismos muy aerobios



por ejemplo los hongos filamentosos, no se pueden guardar en tubos completamente cerrados. Por último, otro inconveniente que tiene la transferencia periódica es que la contaminación de los cultivos resulta más fácil al tener que manejar los tubos a lo largo del tiempo y también por la posibilidad de entrada de ácaros en los mismos.

4.3. Métodos restringidos.

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación. Los cuatro métodos que vamos a citar se basan en la paralización del crecimiento por eliminación del agua disponible para las células.

4.3.1. Deseccación en papel de filtro.

Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatmann nº 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El

vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células

4.3.2. Deseccación en suelo, arena, silicagel, etc.

Se añaden las células a estos sustratos que las protegerán al desecar. Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método.



CAPITULO 5

MEDIOS DE CULTIVO.

5.1. Preparación de Medios de Cultivo.

Hay varios medios de cultivo que se utilizan para el crecimiento in Vitro de *Mycosphaerella fijiensis*. A continuación se describe el procedimiento para la preparación de cada uno de ellos

5.1.1. Agar agua.

(A.A) al 4%, medio de cultivo con nutrimentos que se utiliza para la obtención de descargas de ascosporas a partir de tejido foliar. Se prepara agregando 30 g de agar granulado en 1 l de agua destilada, que se calienta y agita hasta que el agar se disuelve completamente (Fig. 5.1.) El medio se distribuye en recipientes adecuados y se esteriliza durante 20 minutos.

5.1.2. Medio Mycophilm.

Se utiliza para sembrar las ascosporas del hongo (cultivo Monospórico). Para su preparación se procede a pesar 200 g de soya y 14 g de agar, luego se coloca la soya en agua caliente para sacar la cáscara que recubre este grano, después de haberle sacado la cáscara se lo hervirá hasta que el líquido se tome de color amarillo. Luego el líquido es filtrado con una gasa doblada en tres capas (Fig. 5.2), se coloca el agar, esto se mezcla por unos minutos y se esteriliza durante 20 minutos (estas concentraciones son utilizadas para preparar 1000 ml de medio de cultivo) pH óptimo 5.5 a 6.00.

5.1.3. Medio V8.

Medio muy nutritivo que estimula la esporulación del hongo. En su preparación se utilizan 800 ml. de agua destilada, a la cual se le agregan 200 ml de jugo vegetal V-8, 3 g, de carbonato de calcio y 14 g de agar. la mezcla se calienta y agita hasta que los componentes se disuelvan completamente. El medio se coloca en recipientes apropiados de preferencia cajas de Petri; los cuales se esterilizan durante

20 minutos, (concentración utilizada para 1000 ml de medio)

pH óptimo es de 5.5 a 6.00.

5.1.4 Medio PDA.

Medio muy nutritivo que estimula la esporulación del hongo. Para su preparación se utilizan 200 g de papas peladas y partidas, las cuales se cocinan en 500 ml de agua destilada durante 1 hora. Simultáneamente, en otro recipiente caliente y mediante agitación se disuelve el agar en 500 ml de agua destilada. El extracto de papas se cuela usando una gasa doblada en varias capas y se mezcla con el agar disuelto. A esta solución se le agrega 20 g de dextrosa. También se puede PDA en polvo (39 g/L.). El volumen total se lleva a 1l y se esteriliza por 20 minutos. pH óptimo 5.5 a 6.00.

5.2. Esterilización.

Hay varios métodos de esterilización, estas son las más utilizadas:

5.2.1. En autoclave.

Los medios de cultivo se esterilizan, en recipientes de 1l a 120°C y 15 libras de presión por pulgada cuadrada, durante



BIBLIOTECA NORMAL Y ESPECIAL

20 minutos. Los recipientes grandes deben esterilizarse por más de 20 minutos (Fig. 5.3.)

5.2.2. De la cristalería.

La cristalería se esteriliza utilizando aire caliente, para lo cual esta se coloca en la estufa a 160°C – 180°C durante 1 h. También se pueden usar materiales desechables, los cuales vienen estériles (Fig. 5.4.).

5.2.3. Llenado de cajas Petri con el medio de cultivo.

Después de la esterilización del medio de cultivo y de las cajas de Petri, éstas se llenan con el medio de cultivo. Para esto se utiliza la cámara de transferencia, si no dispone de una cámara de este tipo, se humedece la superficie de una mesa con un desinfectante líquido y se evitan las corrientes de aire. El procedimiento para el llenado de las cajas Petri es el siguiente:

- ❖ El recipiente que contiene el medio de cultivo se destapa, evitando tocar la boca del frasco, el cual debe pasarse sobre la llama de una lámpara de alcohol.
- ❖ La tapa de la caja de Petri se abre únicamente lo necesario para colocar sobre ella la boca del recipiente que

contiene el medio de cultivo y se dispersa de 20 a 25 ml. de líquido.

❖ La caja de Petri y el recipiente se tapan. La caja se agita con movimiento de rotación para que el medio de cultivo se distribuya uniformemente.

❖ El medio del cultivo debe solidificarse antes de usarse.

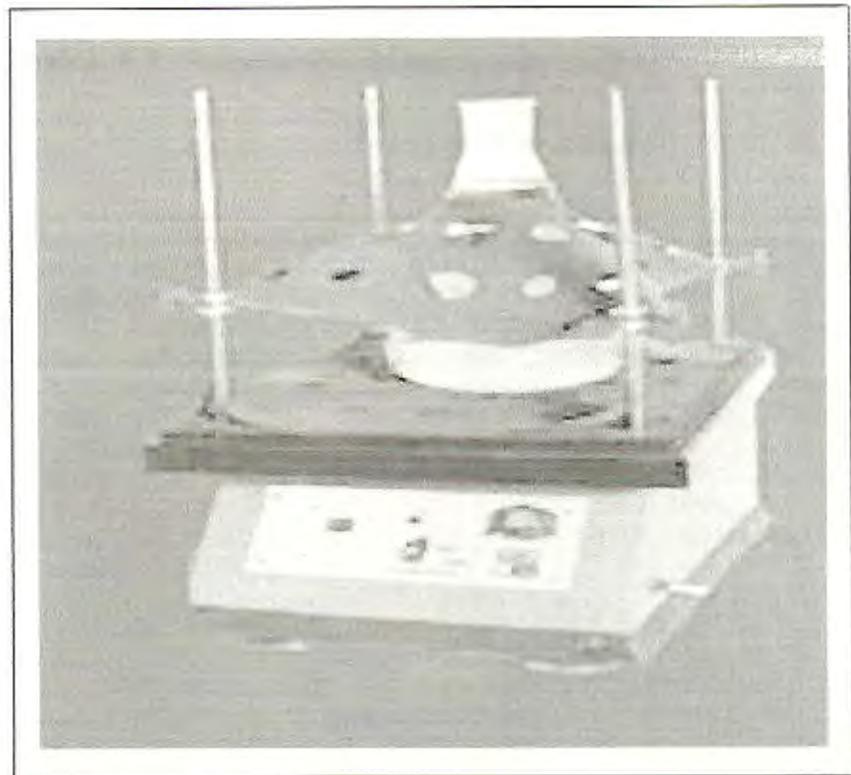


Figura. 5.1. Plato Calentador y Agitador

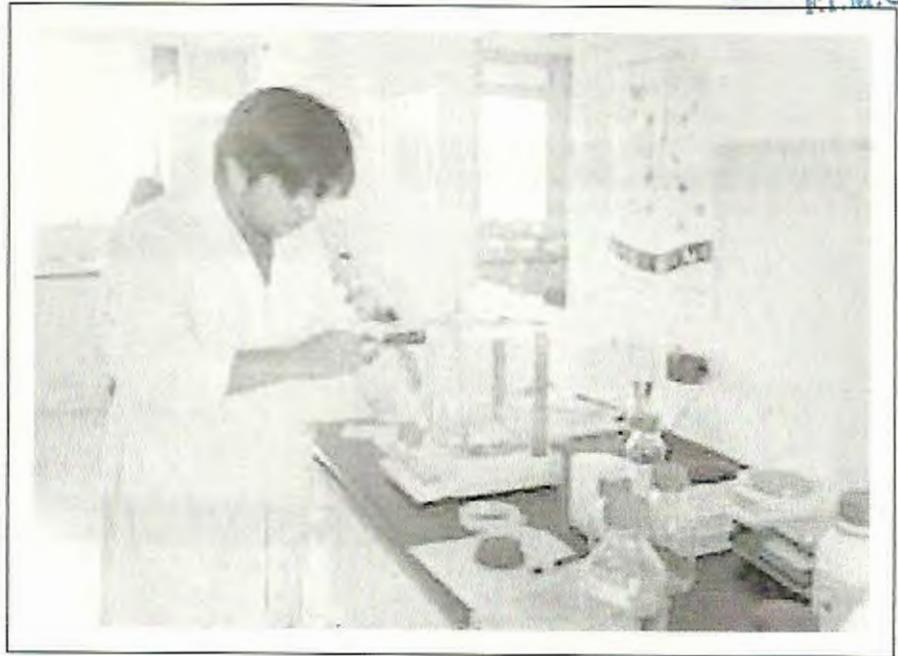


Figura. 5.2. Preparación de Medios de Cultivo.



Figura. 5.3. Autoclave.

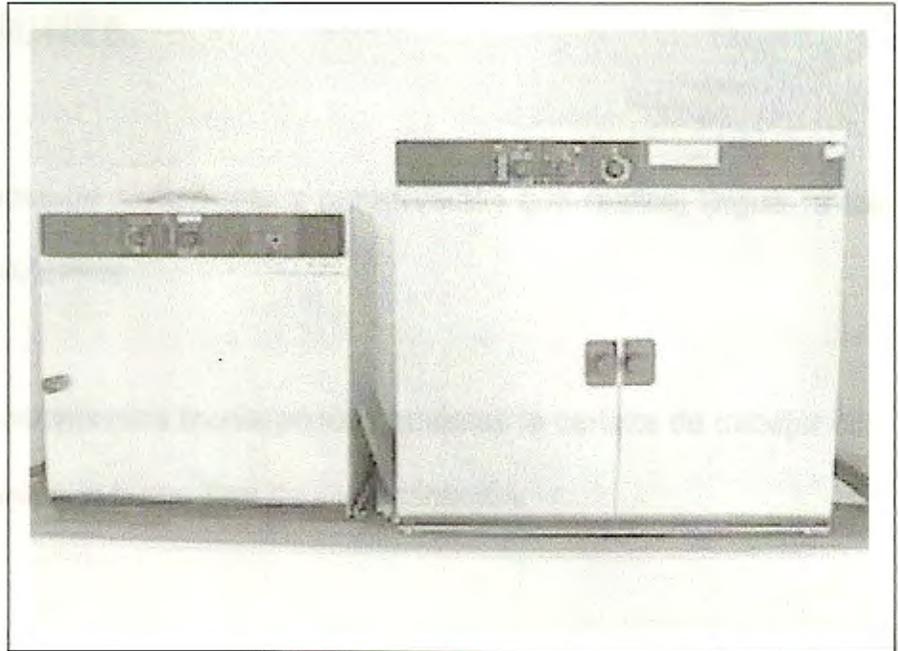


Figura 5.4 Estufa.



CONCLUSIONES.

En las actividades de aislamiento y conservación que realice, llegue a las siguientes conclusiones:

Que al utilizar aislamientos monospóricos tenemos la certeza de trabajar con cultivos en su mayoría puros libre de contaminación.

Además se podría señalar, que el método de conservación en el cual se utiliza el Nitrógeno es el más conveniente, ya que éste realiza una congelación inmediata y no hay presencia de daño celular, conservando su genética.

RECOMENDACIONES.

En las actividades de laboratorio siempre es necesario brindar las siguientes recomendaciones:

Los medios de cultivo a utilizar, es preferible que sean vaciados en las cajas de Petri cuando estén tibios, para no correr riesgos de solidificación. Pues si sucede esto se los debe sacar de la cámara de flujo y retornar a colocarlos al calor corriendo el riesgo de contaminación.

Las cajas de Petri que tengan en su interior algún tipo de aislamiento, ya sea este Monospórico o de cualquier otro tipo antes de ser llevadas a la incubadora deben ser selladas con cinta aislante Rollopak o Mycophilm. Para evitar la contaminación tanto del aislamiento como del equipo.

Al trabajar en la conservación del patógeno y utilizar el método de uso de Nitrógeno líquido, debemos tomar en cuenta que al introducir los microtubos a este elemento se lo debe hacer vertiginosamente, contando cinco segundos y sacándolo, ya que si se lo deja por mas tiempo se corre el riesgo de que los microtubo se revienten y se pierde el material a conservar.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Santos E; Estudio de la Densidad y Tamaño de Estomas en Variedades.
Tesis de Grado. ESPOL. 2003.

- 2.- Recomendaciones para el Cultivo del Plátano
E-mail: <http://www.icta.gob.gt/pdfs/cultivoplatano.PDF>.

- 3.- El Cultivo del Plátano. Infoagro
E-mail: <http://www.infoagro.com>.

- 4.- La más importante enfermedad de la fruta mas importante. Tropical
Research and Education Center. University of Florida, IFAS, Homestead. 2003
E-mail: <http://www.iicasinet.net/pub/sanveg/html/aps/banano/sigatokanegra.html>

5. - Enfermedades Fúngicas
E-mail: <http://www.ceniap.gov.ve>.

6. - Sigatoka Negra. The American Phytopathological Society. 2005.
E-mail: www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/BlackSigatokaEspanol.

7.- Gómez. D. et al; METODOLOGIA PARA LA MANIPULACION Y CULTIVO in vitro de Mycosphaerella fijiensis* CATIE.

E-mail: <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip53/ht53-a.htm>

8.- García L. María Dolores y Fernández Federico; LA CONSERVACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).
Universitat de València. 46100 Burjassot (Valencia).

E-mail: cect@uv.es. <http://www.uv.es/cect>

