



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

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

**“INFLUENCIA DE FACTORES ABIOTICOS SOBRE LA
EXPRESION DEL VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO (BSV)
EN PLANTAS DE BANANO”**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Presentado por:

Omar Oswaldo Olvera Vaca

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año – 2003

AGRADECIMIENTO

A todas las personas que colaboraron en este trabajo de investigación y que merecen ser nombradas: Dra. Sofía Korneva, Dr. Anselmo Otero, Dr. Amano Gasupi, Dr. Miguel Ramos, Dr. Sabino Hernández, Sr. Cyndrich Miljenko Ing. Bernardo Manzano, Biol. José Flores, Biol. Miguel Gutiérrez, Sr. Jorge Villavicencio, M.Sc.
Florence Malafose (INIBAP).

Dejo constancia de mi profundo aprecio y creer en la juventud que sí, podemos hacer investigaciones aplicadas para resolver problemas nacionales como es el Virus del Rayado del Banano (BSV), al Dr. Rodolfo Maribona, Director de mí Tesis, por su ayuda invaluable.

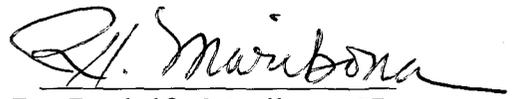
DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres que con su amor y esfuerzo me ayudaron a salir adelante en este logro profesional y a mí esposa e hijo por tenerme paciencia y darme ánimo a no desfallecer en esta meta.

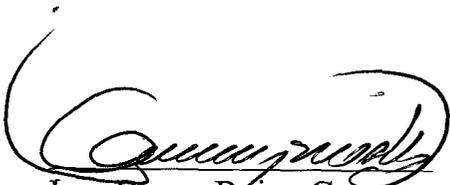
TRIBUNAL DE GRADUACION



Ing. Francisco Andrade S.
DECANO (e) FIMCP
PRESIDENTE



Dr. Rodolfo Maribona H.
DIRECTOR DE TESIS



Ing. Bruno Reina G.
VOCAL



Ing. Andrés Brando V.
VOCAL

DECLARACION EXPRESA

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



Omar Oswaldo Olvera Vaca

Omar Oswaldo Olvera Vaca

RESUMEN

Unas de las secuelas de gran impacto económico del Fenómeno del Niño en la economía agrícola ecuatoriana en el año 1998 fue la aparición en diferentes sectores del área bananera de la enfermedad provocada por el Virus del Rayado del Banano (BSV).

No obstante, que oficialmente la intensidad de esta **epifítia** no ha sido monitoreada, existen reportes sobre los daños provocados por el BSV por la compañía Ubesa (Tabla # 2, pag. 22) el año 1992 hasta 1996. En este reporte se cuantifica en 124.788 plantas erradicadas por infección con BSV.

En la actualidad, durante el transcurso de este trabajo se ha podido constatar que la presencia del BSV ha comenzado extendiéndose a las zonas más nórdicas, centros y sur del sector bananero a lugares tales como: Patricia Pilar, Quevedo, Empalme, Valencia, La Maná, Vinces, Milagro, El Triunfo y Bucay etc.

Por lo cual esta enfermedad se está convirtiendo, en una enfermedad mayor del banano y plátano del Ecuador. Meritoria de su estudio para fundamentar medidas de diagnóstico y control.

El objetivo general de este trabajo ha sido:

Establecer los síntomas típicos ocasionados por el Virus del Rayado del Banano (BSV) y su efecto sobre el vigor en plantas de banano en distintas etapas de desarrollo, sometidas a estrés abiótico.

Los objetivos específicos:

- Establecer el diagnóstico diferencial visual en plantas adultas de banano.
- Estudiar los efectos del estrés térmico, hídrico y la influencia hormonal en la expresión de los síntomas del BSV y vigor en plantas juveniles cultivadas **in vitro**.
- Detectar precozmente los síntomas del BSV, en plantas procedentes de cultivo de tejido.
- Confirmar la sintomatología mediante la comprobación de la presencia del BSV en las hojas de Banano por **microscopía electrónica**.

Para lograr los objetivos planteados se tomaron plantas de banano de la variedad Valery del grupo Cavendish (AAB), de la Agrícola Martinica ubicada en Baba de la provincia de Los Rios, plantas diagnosticadas como enferma por inmuno ensayo (Dr. Lockhart B.). Esta prueba serológica fue confirmada, por aislamiento y caracterización del virus por **microscopía electrónica** (Instituto de Higiene Leopoldo Izquieta Pérez, Guayaquil).

Los hijuelos de las plantas diagnosticadas como enfermas y sanas fueron micropropagadas en el laboratorio de SEBIOCA S.A. (Sociedad Ecuatoriana de Biotecnología, Guayaquil).

Las plántulas asintomáticas obtenidas, por micropropagación fueron cultivadas in vitro en condiciones de estrés por frío, estrés hídrico, y hormonal para investigar el rol de estos estrés en la expresión de los síntomas de la enfermedad (Cap. 5 pag. 44)

Las plántulas fueron cultivadas consistieron en 7 medios cultivo diferentes a 3 diferentes temperaturas, con plantas sana y enferma, totalizando 42 tratamientos (7x3x2). Para cada tratamiento se tomaron 20 plantas que representa de un total de 840 muestras. Se empleo un diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial. Se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento: área foliar, altura, peso de las plántulas y número de raíces.

Los resultados de los diagnòsticos realizados en plantas adultas y las evaluaciones de plántulas micropropagadas condujeron a los siguientes conclusiones :

- Los síntomas diferenciales de plantas adultas enfermas en el campo fueron el rayado amarillo que se torna en café oscuro y la presencia

de lesiones necróticas en las nervaduras de las hojas inferiores y un moteado clorótico en el área foliar. Estos síntomas permiten diferenciar el BSV de otras enfermedades.

- Se observó que existe un crecimiento vegetativo heterogéneo de las plantas sanas y enfermas en el periodo de estrés de los tratamientos previos in vitro de 18° C y 26° C. La presencia de concentraciones mayores de PEG de 6% y 9% disminuye el crecimiento vegetativo in vitro. En el periodo de enraizamiento y adaptación las plántulas se recuperaron significativamente.
- Las plántulas enfermas en condiciones de cultivo in vitro presentaron síntomas de la enfermedad en un 20 %, cuando fueron sometidas al estrés combinado de frío y estrés hídrico. Estos síntomas aumentaron a un 50 %, cuando las plántulas fueron transplanta y cultivadas en el invernadero, se observó que los síntomas resultaron semejantes a las que se presentan en plantas adultas enfermas con el BSV presencia de **un rayado amarillo** en las hojas.
- Por primera vez en el Ecuador se logró el aislamiento, purificación por ultracentrifugación en CsCl y caracterización por microscopia

electrónica, de un virus de planta, realizado mediante **modificaciones exitosas del** protocolo descrito por (Lockhart, 1986).

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	II
INDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
INDICE DE FIGURAS.....	V
INDICE DE TABLAS.....	VI
INDICE DE ANEXOS.....	VII
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 1	
1. GENERALIDADES DE LOS VIRUS.....	4
1.1 Composición y estructura.....	5
1.2 Funciones biológicas de los componentes.....	6
1.3 Infección y replicación viral.....	7
1.4 Los virus que infectan a la especie de Musa ssp	9
CAPITULO 2	
2. IMPORTANCIA Y DISTRIBUCION DEL VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO (BSV).....	12

2.1 Composición química del BSV.....	12
2.2 Síntomas característicos de la enfermedad viral.....	13
2.3 Determinación de los rangos de hospedero del patógeno.....	15
2.4 Formas de transmisión del virus.....	16
2.5 Influencia de factores bióticos y abióticos en la expresión de los síntomas.....	16
2.6 Evidencia de la distribución de enfermedades vírales del banano del Ecuador: Virus del Rayado del Banano (BSV) y el Virus del Mosaico del Pepino (CMV).....	20

CAPITULO 3

3. TECNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACION DE LOS VIRUS.....	23
3.1 Transmisibilidad.....	23
3.2 Infección de Plantas Indicadoras.....	24
3.3 Comportamiento Biológico y Físico-Químico in vitro	24
3.4 Diagnóstico inmunológico.....	26
3.5 Análisis ultraestructural del BSV y genómico.....	27
3.6 Estructura y expresión del genoma del BSV.....	28
3.7 Análisis de marcadores moleculares.....	31

CAPITULO 4

4. EFECTOS DE FACTORES ABIOTICOS DEL CULTIVO DE TEJIDO SOBRE LA EXPRESION DEL BSV.....	34
4.1 Influencia de la temperatura y precipitación pluvial en condiciones de campo.....	34
4.2 Influencia del cultivo de tejido.....	36
4.3 Influencia de sustancias antivirales.....	37

CAPITULO 5

5. MATERIALES Y METODOS.....	39
5.1 Etapas del proceso de desarrollo de la investigación.....	39
5.2 Preparación de los medios de cultivo de banano.....	42
5.2.1 Tratamientos correspondientes a la investigación.....	43
5.2.2 Preparación de los medios con BAP.....	43
5.2.3 Preparación de los medios con PEG.....	44
5.3 Propagación in vitro de plantas sanas e infectadas.....	45
5.3.1 Explantación.....	45
5.3.2 Introducción in vitro.....	46
5.3.3 Propagación.....	47

5.3.4 Periodo de estrés.....	48
5.3.5 Periodo de enraizamiento.....	49
5.3.6 Periodo de adaptación e invernadero.....	50
5.4 Toma de la muestra foliar para la purificación.....	50
5.5 Obtención y purificación del virus para el diagnostico.....	51
5.6 Diagnóstico del virus del rayado del banano (BSV) por microscopia electrónica de transmisión.	53

CAPITULO 6

6. ANALISIS ESTADISTICO.....	54
6.1 Los factores de estudio.....	54
6.2 Interacciones presentes.....	54
6.3 Tratamientos en estudio.....	55
6.4 Análisis funcional.....	57

CAPITULO 7

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
7.1 Descripción de las plantas adulta con síntomas.....	58
7.2 Descripción de los síntomas atípico.....	59
7.3 Evaluación de síntomas en hijuelos de plantas madres	

enfermas.....	60
7.4 Descripción asintomática en la etapa de propagación.....	60
7.5 Valores de crecimientos en la etapa de propagación.....	61
7.6 Vitro plantas con síntomas precoz en el periodo de enraizamiento.....	72
7.7 Plántulas con síntomas en la etapa de invernadero.....	73
7.8 Síntomas de variación somaclonal.....	74
7.9 Confirmación por microscopia electrónica.....	74
CAPITULO 8	
8. CONCLUSIONES.....	75
8.1 Plantas adulta de banano con síntomas foliares causado por el BSV.....	75
8.2 Los efectos del estrés térmico, hídrico y hormonal en plántulas juveniles.....	76
8.3 Plántulas con síntomas precoz de cultivo de tejido.....	76
8.4 Comprobación de la partícula viral en las hojas de banano.	77
RECOMENDACIONES.....	78
ANEXOS.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	114

ABREVIATURAS

BSV	Virus del rayado del banano
CMV	Virus del mosaico del pepino
PEG	Polietilen glicol
BAP	6-bencilaminopurina
PVP	polivinipirrolidina
P ₁	pase de subcultivo de meristema
m ₁	Peg 1 (3% ó 15g / 500 ml)
m ₂	Peg 2 (6% ó 30g / 500 ml)
m ₃	Peg 3 (9% ó 45g / 500 ml)
m ₄	Omar 1(Sin BAP en el medio de cultivo)
m ₅	Omar 2 (5 veces menor de la dosis normal es 0.4ml / 500 ml)
m ₆	Omar 3 (testigo es la dosis normal en 2 ml / 500 ml)
m ₇	Omar 4 (5 veces mayor de la dosis normal es 10 m l/ 500 ml)
i ₁	Presencia de virus
i ₂	Ausencia de virus
t ₁	18°C
t ₂	26°C
t ₃	18° C a 34°C

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Descripción esquemática de una infección viral del BSV en una célula vegetal.....	9
Figura 2 Síntomas típico del BSV.....	14
Figura 3 Síntomas locales del BSV en la fruta de banano.....	15
Figura 4 Síntoma de hospedero del BSV.....	15
Figura 5 La cochinilla que transmite el BSV.....	16
Figura 6 Partículas virales baciliformes del Virus del Rayado del Banano (BSV).....	28
Figura 7 Esquema del proceso de los tratamientos in vitro	41
Figura 8 Distribución de los hijuelos con BSV antes de la introducción in vitro	46
Figura 9 Fases de la introducción in vitro	47
Figura 10 Etapas del proceso de propagación	47
Figura 11 Diferentes concentraciones de PEG.....	49
Figura 12 Plántula en un medio normal de enraizamiento	49
Figura 13 Distribución de las plántulas en el invernadero.....	50
Figura 14 Metodología de la purificación del BSV.....	52
Figura 15 Síntomas típico de la enfermedad del BSV en la variedad	

Valery.....	58
Figura 16 Síntomas atípicos del BSV.....	59
Figura 17 Los hijuelos en estado asintomático.....	60
Figura 18 Etapa de propagación P2.....	60
Figura 19 Evaluación del área foliar en los diferentes períodos de crecimientos.....	63
Figura 20 Crecimiento de altura de las plantas por los tratamientos en los diferentes períodos.....	66
Figura 21 Datos crecimiento de peso de plantas por los tratamientos en los diferentes períodos.....	68
Figura 22 Distribución del crecimiento radicular por los tratamientos en el período de estrés.....	70
Figura 23 Distribución del crecimiento radicular por los tratamientos en el período de enraizamiento.....	71
Figura 24 Cultivo in vitro en condiciones de estrés.....	72
Figura 25 Plántulas sometidas a 38° C.....	73
Figura 26 Plántulas con síntomas precoz del BSV en la etapa de invernadero.....	73
Figura 27 Plantas de variación somoclonal.....	74
Figura 28 Partículas virales baciliformes del virus del rayado del banano (BSV)	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Enfermedades abióticas o inducidas por estrés físico o Químico.....	19
Tabla 2	Plantas eliminadas por El Virus del Rayado del Banano (BSV), en 13 periodos durante los años 1992 – 1996(CIA. UBESA).Ecuador 2002.....	21
Tabla 3	Incidencia (%) del Virus del Estriado del Banano (BSV) en Cultivares de banano en tres localidades .Ecuador 2002.....	21
Tabla 4	Incidencia (%) del Virus del Estriado del Banano (BSV) en Cultivares plátano en tres localidades. Ecuador 2002.....	22
Tabla 5	Número de plantas con síntomas BSV evaluadas en cuatro localidades de la Provincia de Los Rios por Reyes, W en 1997.....	22
Tabla 6	Genotipos infectado por el BSV en Australia .1992.....	27
Tabla 7	Las principales pruebas serológicas de aplicación para el diagnostico de los virus	33
Tabla 8	El efecto de la infección con el BSV sobre el desarrollo de las plantas, rendimiento y calidad de fruta, Australia 1996.	35
Tabla 9	Preparación de medios de cultivo de banano en la etapa	

de propagación.....	42
Tabla 10 Distribución de medios de cultivos y Temperatura del experimento.....	43
Tabla 11 Diferentes concentraciones de hormonas BAP en el medio de cultivo.....	44
Tabla 12 Medios de cultivo para los tratamientos con PEG.....	44
Tabla 13 Diferentes concentraciones de PEG en el medio de cultivo	45
Tabla 14 Codificación de los tratamientos.....	55

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Prueba de ELISA por el Dr. Bell Lockhart (EE.UU).....	80
Anexo 2 Datos Meteorológicos (promedios de 30 años) de la Estación de Babahoyo	81
Anexo 3 Propagación in vitro de plantas sanas e infectadas.....	82
Anexo 4 Purificación del BSV.....	83
Anexo 5 Area foliar del periodo de estrés.....	84
Anexo 6 Análisis de varianza del área foliar del periodo de estrés.....	85
Anexo 7 Prueba de significación, área foliar en el periodo de estrés Tukey al 5% para medios de cultivos, M x I , DMS al 5% I	86
Anexo 8 Tukey al 5% para temperatura, y M x T.....	87
Anexo 9 Tukey al 5% IxT, M x I x T.....	88
Anexo 10 Area foliar del periodo de enraizamiento (18°C y 26°C).....	89
Anexo 11 Análisis de varianza del área foliar en el periodo de enraizamiento.....	90
Anexo 12 Prueba de significación, área foliar en el periodo de enraizamiento, TUKEY el 5% para Temperatura, I x T.....	91
Anexo 13 Area foliar periodo de adaptación (bloque 18 C y 26 C).....	92
Anexo 14 Análisis de varianza del área foliar del periodo de adaptación.....	93
Anexo 15 Prueba de significación área foliar, Tukey al 5% para	

Medios de cultivos, M x I y DMS al 5% para inoculación, Temperatura.....	94
Anexo 16 Altura en el periodo de estrés (Bloque 18°C, 26°C y 18°C- 34° C).....	95
Anexo 17 Análisis de varianza de altura en el periodo de estrés.....	96
Anexo 18 Prueba de significación de altura en el periodo de estrés Tukey al 5% para medios de cultivos, M x I, Temperatura y DMS al 5% para Inoculación.....	97
Anexo 19 Tukey al 5% M x T, I x T.....	98
Anexo 20 Tukey al 5% M x I x T.....	99
Anexo 21 Altura en el periodo de enraizamiento 18° C y 26° C.....	100
Anexo 22 Análisis de varianza de altura en el periodo de enraizamiento.....	101
Anexo 23 Altura en el periodo de adaptación.....	102
Anexo 24 Análisis de varianza de altura en el periodo de adaptación	103
Anexo 25 Prueba de significación de altura en el periodo adaptación Tukey al 5 % para Medios de cultivos y DMS al 5% para inoculación.....	104
Anexo 26 Peso en el periodo de estrés (Bloque 18° C, 26° C y 18° C- 34° C).....	105
Anexo 27 Análisis de varianza en el peso en el periodo de estrés.....	106
Anexo 28 Prueba de significación de peso en el periodo de estrés	

Tukey al 5% para medios de cultivos, temperatura, M x T y DMS al 5% para inoculación.	107
Anexo 29 Tukey al 5% para I x T.....	108
Anexo 30 Peso en el periodo de enraizamiento.....	109
Anexo 31 Análisis de varianza en el peso en el periodo de enraizamiento.....	110
Anexo 32 Prueba de significación de peso en el periodo de enraizamiento, Tukey al 5% para medios de cultivo, M x I, I x T y DMS al 5 % para temperatura.....	111
Anexo 33 Crecimiento radicular periodo de estrés.....	112
Anexo 34 Crecimiento radicular en el periodo de enraizamiento.....	113

INTRODUCCION

EL cultivo de banano en el Ecuador, es el primer producto agrícola que genera más divisas para el país por concepto de exportación.

En nuestro país, se ha confirmado la presencia del Virus del Rayado del Banano (BSV). Frecuentemente se confunde en las primeras etapas de la infección con el Virus del Mosaico del Pepino (CMV). La infestación de virus ha superado el 5% de la plantación de banano (Estación Experimental Boliche).

Sobre el efecto del cultivo de tejido de meristemo, tratamiento físicos químicos para obtener semillas libre de virus se conoce que no se logra un saneamiento del Virus del Rayado del Banano, debido a que se encuentra integrado en el genoma de la célula. Es importante que exista un sitio de cuarentena de los meristemas que se va a propagar, así como poder diagnosticar en estadías juveniles la presencia del virus.

Son los factores ecológicos que influyen sobre los virus tales como: la variedad de Musa, raza del virus, momentos de la infección, condiciones ambientales, nivel nutricional y la presencia de vectores

En 1998, la superficie afectada por el "Fenómeno del Niño" fue de 24.803 hectáreas, entre perdidas ó tierras saturadas, que representó el 17,23% de las 143.961 hectáreas. El estrés ocasionado por la saturación hídrica de los suelos y los cambios de temperatura provocaron el incremento de síntomas de BSV en las plantaciones de banano. Este incremento de la enfermedad no solo arrojó pérdidas sustanciales sino que diversificó la expresión sintomática del BSV. Consecuentemente, el control de la enfermedad es mediante la erradicación en las unidades de producción, se requiere un diagnóstico certero capaz de diferenciar la enfermedad del BSV de otras afectaciones comunes en las condiciones de estrés nutricional, térmico o hídrico.

Gran parte de la reposición de las bananeras afectadas fueron rehabilitadas mediante plantas propagadas **in vitro**. Ha sido también reportado, que el cultivo **in vitro** del banano induce la expresión episomal del virus del rayado del banano (BSV), de los integrantes del BSV en el genoma B de Musa.

Esta investigación tiene como tema él: **"ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE FACTORES ABIOTICOS SOBRE LA EXPRESION DEL VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO (BSV) EN PLANTAS DE BANANO"**.

Se planteo la siguiente hipótesis:

Existe influencia de factores abióticos que causan la expresión del BSV.

Para lograr demostrar esta hipótesis, se planteó el siguiente objetivo:

OBJETIVO GENERAL

Establecer los síntomas típicos ocasionados por el Virus del Rayado del Banano (BSV) y su efecto sobre el vigor en plantas de banano en distintas etapas de desarrollo, sometidas a estrés abiótico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer el diagnóstico diferencial visual en plantas adultas de banano.
- Estudiar los efectos del estrés térmico, hídrico y la influencia hormonal en la expresión de los síntomas del BSV y vigor en plantas juveniles cultivadas **in vitro**.
- Detectar precozmente los síntomas del BSV, en plantas procedentes de cultivo de tejido.
- Confirmar la sintomatología mediante la comprobación de la presencia del BSV en las hojas de Banano por **microscopía electrónica**.

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES DE LOS VIRUS

En patología vegetal existen diferentes agentes causales que determinan disciplinas independientes. De tal forma, la patología vegetal indica que las enfermedades pueden ser producidas por agentes bióticos y afectan a las plantas tales como virus, viroides, bacterias, hongos, micoplasmas, protozoarios y agentes abióticos tales como: temperatura, humedad relativa, sequía, carencia de oxígeno, herbicidas, suelos tóxicos (Al, Fe, NaCl), iluminación etc.

Para que se produzca una enfermedad es necesario que exista un contacto e interacción entre los tres componentes: patógeno, hospedante y ambiente. El ambiente puede afectar tanto el crecimiento y la resistencia de la planta hospedante y a la vez el patógeno aumenta o disminuye su grado de virulencia.

La virulencia del patógeno esta dada por la capacidad de replicación del virus en la célula vegetal y su extensión por todo el organismo (1).

Esta capacidad de daño de los virus se basa en la replicación de sus componentes de ácidos nucleicos (ADN o ARN) y la síntesis de las proteínas que ellos codifican al parasitar la célula y que conforman la cápsida de los virus.

1.1 Composición y Estructura

Los virus son patógenos obligados, esta constituido por ácidos nucleicos y proteínas. El ADN o ARN pueden ser de simple o doble cadena. Las proteínas forman una envoltura de protección llamado cápside (1).

La partícula viral se replica en el interior de la célula. El componente infeccioso es el ácido nucleico y las proteínas de la cápsida facilitan el transporte y la infección.

El ADN celular se localiza en el núcleo de la célula eucariótico vegetal, en la mitocondrias y cloroplastos. El ácido desoxirribonucleico, determina la secuencia de los aminoácidos de una proteína determinada y regula la síntesis de la misma.

Los ARN celular se encuentran en el citoplasma de las células, en forma de ARN ribosomal (ARNr), de transferencia (ARNt) y mensajero (ARNm).

En los virus el ADN y el ARN pueden constituir desde un 5-40%, mientras que la proteína de la cápsida varia desde 60 - 95% en cada virus.

Los ARN son los encargados de procesar la información genética para la síntesis de la proteína.

1.2 Funciones biológicas de los componentes vírales

La síntesis y composición de la proteína depende únicamente del ácido nucleico, la proteína sirve como protección del ácido nucleico del virus, pero solo su presencia aumenta el grado de virulencia del mismo.

Los virus para formar su replicación necesitan de la célula para aprovechar un proceso metabólico.

El ADN es la molécula que lleva la información genética codificada de una molécula a otra. La expresión de un gen se hace mediante una copia en ácido ribonucleico, este dirige la síntesis de la proteína específica (26).



La síntesis proteína tiene dos fases:

La transcripción consiste en producir un ARN complementario de una cadena de ADN. El ARNm esta formado por una copia de una porción de ADN.

- La traducción se realiza en el citoplasma por los ribosomas.

La secuencia de los aminoácidos en una cadena peptídica debe hacerse según un orden que se realiza gracias al ARNm, que lleva el mensaje del ADN, comienza desde un punto de inicio AUG. Se expresa a través de los codones. El ARNt lleva en los extremos el aminoácido y el correspondiente al codón del ARNm. Dentro de los ribosomas se forma la cadena peptídica.

El ARNt y el ARNr, están sintetizado por una transcripción de un gen, no existe la etapa de traducir.

La traducción se realiza en el citoplasma por los ribosomas. La secuencia de los aminoácidos en una cadena peptídica debe hacerse según un orden que se realiza gracias al ARNm, que lleva el mensaje del ADN comienza desde un punto de inicio AUG. Se expresa a través de los codones. El ARNt lleva los extremos el aminoácido y el correspondiente codón del ARNm. Dentro de los ribosomas se forma la cadena peptídica.

1.3 Infección y replicación viral

La replicación de la partícula viral de doble cadena (ADNds), una vez que ha entrado al núcleo de la célula donde parece enrollarse para luego formar un mini cromosoma se duplica paralelamente y es

transcrito en dos cadenas simples de ARNs. El ARNs pequeño es transcrito al citoplasma donde se encarga de traducir en proteína codificada por el virus y el otro ARN sirve como molde para el proceso de transcripción inversa o se transforma en ADN de doble cadena que luego se encapsula por unidades proteicas para formar versiones completas(1), como se ilustra la figura 1.

El virus aprovecha los aminoácidos del hospedante; pero está ligado de acuerdo a la codificación que lleva el ARN mensajero (viral) que es utilizado exclusivamente por el virus como cubierta.

Los virus disminuyen el nivel de clorofila por hoja que se ve afectado en el proceso de fotosíntesis. También disminuye la calidad de sustancia reguladora de crecimiento (hormona de la planta), al inducir un aumento en las sustancias inhibidora del crecimiento.

Los efectos que muestran los virus sobre los compuestos nitrogenados, sobre compuestos fenólicos tienen gran efecto sobre el crecimiento y diferenciación también de los oxidados.

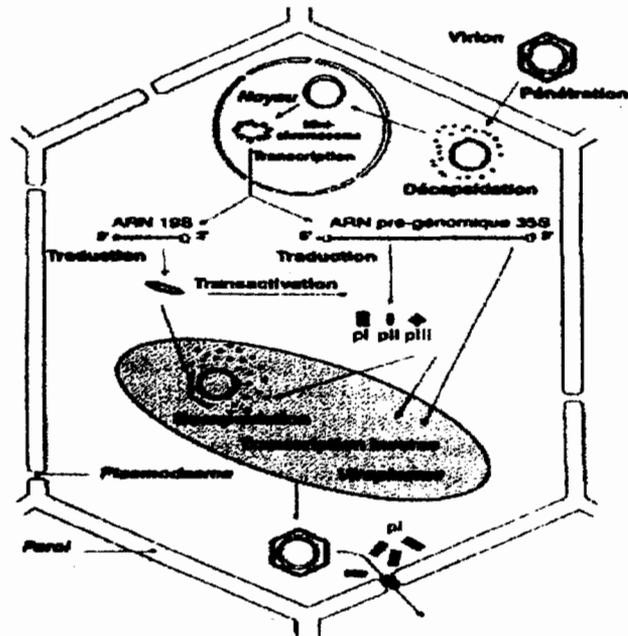


FIGURA 1. Descripción esquemática de una infección viral del BSV en una célula vegetal.

1.4 Los virus que infectan a la especie de *Musa* spp.

Las principales enfermedades víricas identificadas que afectan a las variedades de *Musa* son:

- Virus del arpillamiento del cogollo del banano (BBTV).
- Virus del mosaico de las brácteas del banano (BBMV).
- Virus del mosaico del pepino (CMV).
- Virus del rayado del banano (BSV).
- **Virus del arpillamiento del cogollo del banano (BBTV)**

Es la enfermedad viral que causa mayor daño económico en las plantaciones de banano, se encuentra distribuido en Africa, Asia y Pacífico (36).

Se caracteriza por la apariencia de estrías verde oscuro continuas en lámina foliar y posterior en las nerviaciones, marcado enanismo, apiñamiento de las hojas y no se producen frutos.

La partícula viral es isométrica de 18-20 nm. de diámetro redondo de cadena sencilla de ADN de la familia Circoviridae. Es transmitida por el áfido **Pentalonia nigronervosa** pero no se transmite por inoculación mecánica.

El control de este virus se realiza mediante la erradicación de la planta y eliminación de la presencia del vector.

- **Virus del mosaico de las brácteas del banano (BBMV)**

Este virus se registró primeramente en Filipinas; está presente en Centro y Sur América. Se caracteriza por rayas cloróticas en las brácteas, posteriormente tiene un color rojizo y necrótica en las hojas más viejas.

El material genético del virus es un ARN de cadenas sencillas y tiene la forma de varillas de 750nm de largo. El virus se transmite por medios mecánicos y por áfidos.

- **Virus del mosaico del pepino (CMV)**

Este virus está presente en los siguientes países: Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Venezuela, Taiwan y China. Inicialmente esta enfermedad se

manifiesta en forma de rayas cloróticas paralelas en las hojas más jóvenes y que se extiende a las hojas más viejas; se acompaña de desprendimiento del pseudotallo, necrosis interna y distorsión de los dedos.

El CMV forma parte del grupo de los **Cucomovirus**. Se caracteriza por partículas isométricas de 28nm de diámetro y posee un genoma tripartido de ARN catenario. Esta enfermedad es producida por un virus ARN de la familia Bromoviridae género Cucomovirus. Se transmite en forma no persistente por varios áfidos, entre ellos:

Aphis gossypii A, Craccivirus y Myzus persicae, mecánicamente y por el material de propagación vegetativo proveniente de material enfermo.

Se controla mediante la erradicación de material infectado, eliminación de los insectos vectores y no se logra un saneamiento al 100%, mediante el cultivo de tejido. Las plantas transgénicas con resistencia a la infección del virus del mosaico del pepino se encuentran en la fase de desarrollo.

CAPITULO 2

2. IMPORTANCIA Y DISTRIBUCION DEL VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO (BSV)

Es una enfermedad viral que está incrementando el grado de infección en las plantaciones bananeras año tras año, donde se han informado pérdidas hasta el 40% de la producción de países africanos (36).

Fue descrita por primera vez en el cultivar Poyo (Grupo AAA sub grupo Cavendish) en la costa de Marfil. También se ha registrado en países como Africa del Sur, India, Ecuador, Jordania, Madagascar, Madeira, Marruecos, Mauricio, Nigeria, República de China, Ruanda, Tanzania y Zanzíbar(20).

La variedad Mysore (AAB) que se encuentra infectada por este virus, se la ha observado en Australia, Brasil, Filipinas, Granada, India, Trinidad, y en bancos de germoplasma *in vitro* en Cuba, Guadalupe, Honduras y Jamaica. Han comprobado que el genoma del virus se ha integrado a la célula vegetal.

2.1 Composición química

El Virus del Rayado del Banano (BSV) pertenece al grupo de los Badnavirus, cuya forma es baciliforme que miden 30nm de ancho y

150nm de largo. Su genoma está constituido de ADN doble cadena (ADNdb) circular de 7.1 kb (20). El BSV se expresa de tres maneras: la forma episomal encapsulada, no encapsulada y la forma integral (13).

Los badnavirus no han podido ser eliminados por el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

La partícula viral produce la enfermedad dentro de la planta, cuando aprovecha las sustancias celulares ocupando los espacios libres de las células, proceso celular y alterando los componentes, ocasionando un mal metabolismo en las células, produciendo sustancias anormales que repercuten en las funciones vitales de la planta.

La proteína por sí misma carece de infectividad, pero su presencia aumenta el grado de virulencia del ácido nucleico.

2.2 Síntomas característicos de la enfermedad viral

Los síntomas iniciales del BSV se expresan como un estriado amarillo de líneas entrecortadas, perpendiculares hacia la nervadura central de la hoja, posteriormente el tejido infectado se expresa con rayas necróticas en las hojas en la planta afectada por el BSV, lo cual usualmente no presenta en las afectadas por el CMV. Una característica del BSV es la latencia de la expresión de los síntomas

es decir que tiene la partícula viral pero no presenta síntomas por varios meses. Otros síntomas son la forma de diamante a lo largo de las venas, reducción del vigor, racimos (20).

En Colombia se encontró en plantaciones de plátanos del clon Dominico-Harton infectado por el BSV (38), los síntomas son: un rayado clorótico, rayado necrótico, hinchamiento y cuarteamiento del pseudotallo (Figura 2).

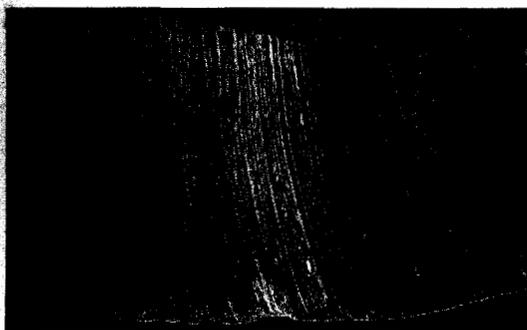


fig. a)



fig. b)



fig. c)

FIGURA 2.a-b-c. Síntomas típicos del BSV: a) un rayado clorótico; b) un rayado necrótico c) cuarteamiento del pseudotallo



fig. a)



fig. b)

FIGURA 3. Síntomas locales del BSV en la fruta de banano Lockhart b – ESPOL-2000; a) lesiones necróticas en el dedo de banano; b) deformación del racimo de banano.

2.3 Determinación de los rangos de hospedero del patógeno.

La mayoría de los badnavirus, el BSV tiene un rango restringido de hospedero, en los que se han confirmado el cultivo de caña de azúcar, plátano del clon Domínico-Harton y en hojas de Achira (*Canna eduli*, Figura 4).



a)



b)

FIGURA 4. Síntomas de hospedero del BSV. a) estrías en la caña de azúcar b) síntoma mosaico en hoja de achira.

2.4 Formas de transmisión del Virus

El BSV es transmitido de forma semi persistente, de plantas de banano infectadas a plantas sanas, por el insecto **Planococcus citri** y **Saccharicoccus sachari** (fig. 5), y la función que cumplen las hormigas para su diseminación y material vegetativo enfermo, que se transmite de planta madre a los hijuelos (8). Es poco probable que el virus se disemine a través de herramientas. Y todavía no existe un saneamiento de plántulas provenientes de cultivo de tejidos.



FIGURA 5. La cochinilla que transmite el BSV, en forma semi - persistente Lockhart B (ESPOL -2000)

2.5 Influencia de factores bióticos y abióticos en la expresión de los síntomas

Las plantas presentan una enfermedad, cuando existe un mal funcionamiento de las células o tejidos del hospedante debido al

efecto de un patógeno o factor ambiental y que origina la aparición de los síntomas. Existiendo dos grupos de enfermedades:

- Enfermedades infecciosas o bióticas de las plantas.

Las enfermedades causadas por organismos vivos-bióticos pueden ser provocadas por patógenos, tales como: hongos, bacteria, microplasma, virus, viroides, nemátodos y protozoarios. Entre las principales sustancias que secretan los patógenos en las plantas se encuentran: las enzimas, toxinas, reguladores del crecimiento y polisacáridos. Excepto los virus o viroides que utiliza las enzimas propias del hospedante modificando la ARN polimerasa de la célula para sintetizar su propio ARN. Podemos mencionar los efectos que tiene los factores bióticas sobre la fisiología de las plantas.

Los organismos patógenos en procesos infecciosos pueden (1):

- Disminuir la fotosíntesis al ser atacadas las plantas por hongos o bacteria. La toxina (tentoxina y la terbttoxina) que producen estos patógenos pueden inhibir la acción de enzimas que intervienen en el proceso fotosintético.
- Interferir con la translocación ascendente del agua y los nutrientes inorgánicos.

- Bloquear la transpiración.
- Interferir la translocación de los nutrientes orgánicos a través del floema. En algunas enfermedades virales, existe una acumulación de almidones en el enrollamiento de la hoja y amarillamiento.
- Afectar la respiración de las plantas enfermas y su ritmo de respiración aumenta y utiliza con mayor rapidez su carbohidrato, y alteran los mecanismos transcripción y traducción

Las enfermedades abióticas son aquellas inducidas por factores físicos o químicos. Entre los factores físicos más frecuentes se describen: estrés hídrico (exceso o carencia de agua), temperatura, iluminación y propiedades físicas del suelo (1).

Entre los factores químicos se describen la salinidad de los suelos, la presencia de iones de metales en concentraciones tóxicas tales como: Fe, K. El abuso de herbicidas es un estrés frecuente en las plantas que pueden confundir síntomas de otras enfermedades. Para el banano han sido descritas diferentes enfermedades abióticas (Tabla 1).

TABLA 1
ENFERMEDADES ABIÓTICOS O INDUCIDAS POR ESTRÉS FÍSICO O
QUÍMICO(45)

FACTOR	C O N D I C I O N E S		
	OPTIMA PROM.AÑO	ENFERMEDAD 1	ENFERMEDAD 2
TEMPERATURA (° C)	20-24	12 Paralización Fotosíntesis	7 Huela racimo/daña fruta/mal sabor
PRECIPITACION (mm)	1200-2000-2500	<1200 Plantación no Prospera	Anegamientos (tabla de agua alta) Crecimiento Deficiente >48h mueren raíces
HELIOFANIA	Brillo solar durante Todo el año	Madurez tardía	Madurez prematura Durante transporte
SUELO Profundidad (m)	1.0-1.5 Profundo con buen Drenaje	<1.0 Crecimiento Deficiente	<.50 Atrofia de las Raíces/mortalidad
SUELO (Textura)	Franca	Suelo arenoso Crecimiento Deficiente	Suelo arcilloso Mal drenaje/Rotura Raíces/mortalidad
SUELO (ph)	6.5-7.5	<6.5 o >7.5 Crecimiento Deficiente	4.0 o 9.0 Malos rendimientos/ Maduración rápida
SUELO CE (ohmios\cm ²)	>6.0	<6.0 Rendimientos Anormales	>8.0 Salinidad cerca del Mar Toxicidad

2.6 Evidencia de la distribución de enfermedades vírales del banano en el Ecuador: Virus del Rayado del Banano (BSV) y el Virus del Mosaico del Pepino (CMV).

En nuestro país la incidencia de virus en ciertas plantaciones de banano ha superado el 5% de población de plantas , esto incide en la maduración precoz de la fruta (Estación Experimental Boliche, 1993).

En nuestro país se confirmó de manera oficial la presencia del Virus del Rayado del Banano (BSV), al enviar muestras con síntomas de BSV al laboratorio de la Universidad de Minnessota (Lockhar B 1993). En el fenómeno del niño de 1998, se observaron síntomas viróticos del BSV en los siguientes sitios: Milagro, El Empalme, Patricia Pilar, Vínces, Valencia, La Maná en las variedades Gran Enano, William y Valery.

A continuación se indica el número de plantas infectadas por el Virus del Rayado del Banano, que han sido erradicadas y contabilizadas 124.788 plantas(1992-1996), por la CIA. UBESA(Tabla 2). **También en las algunas variedades de banano y plátano** que se encuentran infectado por el virus fueron evaluadas por (Reyes, 1997,comunicación personal), como indican las tablas 3, 4,y 5.

TABLA 2

PLANTAS ELIMINADAS POR EL VIRUS DEL RAYADO DEL BANANO (BSV) EN 13 PERIODOS DURANTE LOS AÑOS 1992- 1996. ECUADOR 2002

PERIODOS	1992	1993	1994	1995	1996
1	75	2,924	0	547	713
2	109	806	0	710	333
3	177	998	253	1,037	1,478
4	94	796	966	626	3,184
5	337	1,377	1,303	3,054	405
6	284	1,675	946	577	183
7	732	2,283	1,710	373	2,156
8	1,113	2,419	2,646	1,038	8,086
9	876	3,012	3,113	994	5,760
10	2,142	2,365	2,504	712	5,616
11	5,962	2,388	1,190	540	12,042
12	5,751	3,736	2,363	301	3,196
13	4,489	2,541	1,005	543	3,124
TOTAL	22,141	27,320	17,999	11,052	46,276

Calle H. (Ubesa).

TABLA 3

INCIDENCIA (%) DEL VIRUS DEL ESTRIADO DEL BANANO (BSV) EN CULTIVARES DE BANANO EN CINCO LOCALIDADES. ECUADOR. 2002

CULTIVARES	L O C A L I D A D E S				
	EETP	P. PILAR	VENTANAS	PTO. INCA	EL ORO
FHIA 1	0	0	0	0	0
FHIA 2	0	0	0	0	0
FHIA 3	0	0	0	0	0
VALERY	2	0	0	0	0

La incidencia del BSV es nula en los FHIA 1,2,3.

TABLA 4

INCIDENCIA (%) DEL VIRUS DEL ESTRIADO DEL BANANO (BSV) EN CULTIVARES DE PLATANO EN TRES LOCALIDADES. ECUADOR. 2002

CULTIVARES	L O C A L I D A D E S			
	EETP	EETP	EL CARMEN	PTO.INCA
PLATANO				
FHIA 4	50	38	35	16
FHIA 6	85	0	0	0
FHIA 15	92	0	0	0
FHIA 16	0	100	0	0
FHIA 20	0	26	0	0
FHIA 21	0	59	59	26
DOMINICO	0	3	2	3
BARRAGANETE	4	12	10	1

TABLA 5

NUMERO DE PLANTAS CON SINTOMAS DE BSV EVALUADAS EN CUATRO LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DE LOS RIOS POR REYES W, EN 1997. ECUADOR .2002

LOCALIDADES HDA.	Nº planta viróticas (entre Marzo y Agosto/97)	Nº plantas Evaluadas
LA ELVIRA (Ventanas)	23	200
SAN JAVIER (San Carlos)	30	200
TIERRA VERDE (Via El Empalme)	4	200
Ma. AUXILIADORA (Via El Empalme)	0	200

El porcentaje de infección de BSV de las plantas evaluadas es 7 %

CAPITULO 3

3. TECNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACION DE LOS VIRUS

Los virus pueden ser puestos en evidencia mediante la aplicación de diversas técnicas como:

3.1 Transmisibilidad

Para cada virus citado, se ha indicado la forma en que él mismo se transmite, esto incluye una cierta experiencia del investigador, el identificar ciertos síntomas típicos, en el caso del Virus del Mosaico del Pepino (CMV) y el Virus del Rayado del Banano (BSV) que pueden confundirse con deficiencia de Ca, Zn, B, P y variaciones somaclonales entre los cuales tenemos:

- Plantas enanas.
- Masada.
- Variegado.
- Hoja deforme.
- Plantas ahiladas (Alargamiento).

Los virus pueden ser transmitidos de diversas formas: propagación vegetativa, mecánicamente a través de la savia, semilla, polen, insectos, ácaros, nemátodos y hongos.

3.2 Infección de plantas indicadoras

Para la determinación del patógeno es necesario transmitirlo a las plantas indicadoras para los virus que afectan a esa especie. Entre ellas tenemos:

- **Chenopodium amaranticolor** (susceptible a 40 virus diferentes)
- **Chenopodium quinua.**
- **Cucumis sativus.**
- **Nicotiana glutinosa.**

3.3 Comportamiento biológico y físico-químico in vitro

Las propiedades in vitro solo pueden ser establecidas en virus que se transmiten a través de la savia.

- **Punto inactivación térmica**

Es la temperatura requerida para inactivar el virus que se encuentra en la savia no purificada. La tolerancia al calor in vitro de los virus de las

plantas está en el rango de 45 a 95°C. Se coloca en los tubos de ensayo el extracto, luego en un recipiente con la temperatura deseada, después se pone en los morteros para inoculación en plantas susceptibles.

– **Punto final de dilución.**

Es la máxima dilución a que es sometido el extracto puro del líquido. Por cada dilución debe ser inoculado a plantas susceptibles. El punto de dilución final fue de 10^{-1} a 10^{-3} del CMV.

– **Acción de los compuestos químicos.**

Existen compuestos químicos como: formalina, cianuro de potasio, alcohol etílico, que inactiva a muchos virus, aún en concentraciones mínimas.

– **Longevidad in-vitro.**

Es la determinación de cuanto tiempo se mantiene el extracto a la temperatura ambiente de laboratorio, en cada período de inoculación en plantas diferentes.

3.4 Diagnóstico inmunoquímico.

Existiendo la propiedad de alta especificidad biológica de los antígenos y anticuerpos que permite unirse en sitios específicos de cada patógeno se han desarrollado pruebas inmunoquímicas que son:

- Técnicas de precipitación en medio líquido y en gel de agar. Se refiere a pruebas cuantitativas de precipitación en tubos y la microprecipitación en gotas, un segundo grupo de técnicas se refieren inmuno difusión radial, difusión doble en tubos, placas y también técnicas inmuno electroforéticas.
- Técnicas por aglutinación directa en porta objetos y placas, son usada para el diagnóstico de virus alargado e isométricos.
- Técnicas con anticuerpos marcados: se han desarrollado diferentes tipos de procedimientos.

Inmuno fluorescencia consiste en marcar el anticuerpo con un colorante fluorescente (isocianato de fluoresceína).

- Técnicas Inmunoenzimáticas. Han utilizado enzimas como marcadores, entre ellos están ELISA, DOT-BLOT(36)

Mediante las técnicas inmunoquímicas y de microscopía electrónica fue detectado en Australia en 1992 (Tabla 6), un grupo de genotipo de banano que contenía el BSV (19).

TABLA 6
GENOTIPOS INFECTADO POR EL BSV EN AUSTRALIA.1992.

GENOTIPO	NÚMERO	Localización	DIAGNOSIS
Mysore	417	Thursday Island	ISEM
Mysore	418	South Johnstone Qld.	ISEM
Mysore	419	Wamuran, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Dajaio	420	Wamuran, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	517	Babinda, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	540	Kiamba, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	565	Inmistail, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Lady Finger	573	Flaxton, Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Dwarf Cavendish	576	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Goldfinger	580	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	581	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Ho Chu Chu	587	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Pisang Awak	593	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
Dai Jiao	594-598	Alstonville, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
FHIA 17	621	Cudn, NSW	Miniprep/ISEM, ELISA
French Reversión	643	South Johnstone Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA
Cavendish	668	South Johnstone Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA, PCR
Mysore	669	South Johnstone Qld.	Miniprep/ISEM, ELISA

ISEM (Microscopía electrónica inmunoabsorbente)

ELISA(Ensayo Inmunoabsorbente ligado a una enzima)

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

3.5 Análisis ultraestructural del BSV y genómico

Existen reportes previos donde fueron observadas en el microscopio electrónico, partículas vírales baciliformes del virus del rayado del banano (BSV) con un tamaño de 150 x30 nm. El análisis espectrofotómetro demostró una absorvancia de A 260/280 de 1.2, lo cual es una característica del BSV (Lockhart, 1986), fue aisladas de una muestra foliar de plátano (Musa AAB) del clon Dominicó – Hartón,

con síntomas de rayado clórotico procedente de la localidad de Antioquia - Colombia(38).



FIGURA 6. Partículas virales baciliformes del virus del rayado del banano BSV.

3.6 Estructura y expresión del genoma del BSV.

El virus del rayado del banano (BSV), se expresa de tres formas: Episomal encapsulada, no encapsulada y la forma integrada(13).

– Forma episomal encapsulada

Es la manera que el ADN del genoma del virus está encapsulada por una capa de proteína viral. Esta forma de expresarse se encuentra en plantas con síntomas y asintomáticas.

– Forma episomal no encapsulada

Una de las características de la infección del BSV es la aparición y desaparición periódica de los síntomas. En éste fenómeno de

supresión de síntomas el BSV, se comporta semejante a los paretrovirus, el Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV), en ciertos hospederos. Estudios sobre la supresión de síntomas CaMV han demostrado que este está asociado con la alteración de la replicación viral. La replicación de los Paretrovirus tiene dos etapas, la transmisión desde un superenrollado genoma viral en el núcleo y la transcripción inversa de ARN resultante en el citoplasma. La alteración en CaMV en el estado de transcripción conduce a una acumulación del superenrollamiento genoma viral a otros intermediarios de la replicación no encapsulada. La forma de superenrollamiento puede ser distinguida de otras intermediarias de replicación viral no encapsulada por su migración en gel de electroforesis. Consecuente experimentos son inicialmente planeados para determinar si la biología molecular del fenómeno de supresión de síntomas del BSV se asemeja al CaMV.

– **Forma integral**

Investigaciones reciente indican que la forma integrada del BSV está integrado al genoma del banano en algunas cultivares que pueden ser activados por condiciones de estrés, que pueden dar origen a la forma episomal que ocasionan las infecciones, también se sugiere que existen dos formas de BSV integral.

Segmento inactivo.- Son aquellos segmentos del genoma que no pueden conducir las infecciones episomal a causa de mutaciones o alteraciones.

Potencial activa.- Es identificar las secuencias de nucleótidos activos de la forma integral, por que es probable que la forma episomal sea una copia del ADN viral por la transcripción inversa

Existen muchas interrogantes sobre la activación de ciertos segmentos del genoma viral y la interacción de estrés.

Mencionaremos informe del Grupo de trabajo PROMUSA en Virología (5), con respecto al Virus del Rayado del Banano (BSV).

Las investigaciones indican que existen claras evidencias que la infección en el BSV surgen de las secuencias vírales integradas en el genoma de Musa. Tanto las secuencias "activables" (que se expresan episomalmente) y "no activables" (que no se expresan episomalmente) del BSV están integrados en el genoma de Musa (5).

Un segmento integrado activable del BSV (BSV-OL) está asociado con el genoma B de Musa y no con el genoma A. Otras especies moleculares del ADN del BSV episomal (BSV-GF, BSV-IM y BSV-MYS) están también integrados en el genoma de Musa (5).

Los integrantes vírales que se manifiestan episomalmente (BSV-OL, BSV-GF, BSV-IM), ocurren ampliamente en plátano (AAB) y banano (AAA) en América Central y del Sur. Una de las conclusiones es que estas especies moleculares de BSV no han sido introducidas en nuevas áreas cultivares con híbridos tetraploides AAAB producidas por diferentes programas de mejoramiento. Sin embargo bananos del grupo AAA se ha encontrado en Costa Rica, Ecuador y Venezuela, las infecciones episomales con el BSV-OL y BSV-GF que han resultado de una infección latente preexistente o de la transmisión del virus de los plátanos (5).

Existe una hipótesis que la expresión episomal de los integrantes del BSV en el genoma B de Musa parece requerir la presencia del genoma A. Este modelo es apoyado por todos los fenómenos similares de infecciones vírales en el tabaco y la petunia.

3.7 Análisis de marcadores moleculares

Algunas de las técnicas de detección de ácidos nucleicos se basan en la complementariedad de las bases, que permite la hibridación molecular.

Existen dos grupos(36):

a. **Hibridación de ácidos nucleicos:** se distinguen varios métodos.

Southern-Blot (para ADN)

Northern-Blot (para ARN)

Dot-Blot (para ADN y RNA)

Los ácidos nucleicos son sometidos a un proceso de electroforesis en gel de agarosa, transferido a una membrana de nylon ó nitrocelulosa. La detección se hace mediante el empleo de una sonda molecular marcada isotópicamente ó con marcaje no radiactivo. Dicha sonda es la que híbrida con el ADN de interés.

- b.- **Amplificación enzimática de ácidos nucleicos**, existiendo varias técnicas para el diagnóstico de virus.

Reacción de cadena de la polimerasa (PCR): Es un método enzimático in vitro que utiliza cebadores oligonucleotidos complementarios al ADN de molde y existen varias técnicas.

La técnica de inmunocaptura PCR(IC-PCR): es diez veces más sensible que el ISEM, para la identificación del BSV.

PCR con Inmuno transcripción inversa (RT-PCR).

A continuación se detalla la situación actual del diagnóstico de los Virus de Musa (18) y su disponibilidad (Tabla 7).

TABLA 7
LAS PRINCIPALES PRUEBAS SEROLOGICAS DE APLICACIÓN PARA
EL DIAGNOSTICO DE LOS VIRUS

VIRUS	DIAGNOSTICO (S)	COMENTARIOS
BBTV	ELISA	Antisuero comercial detecta las cepas Conocidas
BBrMv	PCR Miniprep+ISEM ELISA Normalización con miniprep + ISEM	Sensible pero específico de la cepa. Antisuero policlonal y antisuero Recombinante disponible *
BanMV	Miniprep+ISEM Método estandarizado	Antisuero policlonal disponible *
AbaMv	Miniprep+ISEM Método Normalizado	Antisuero policlonal disponible *
CMV	ELISA Método Normalizado-el mismo antisuero	Antisuero policlonal comercial disponible Detecta ambos serotipos
BSV (épisomal)	Miniprep+ISEM IC-PCR Método normalizado miniprep + ISEM	Antisuero poli-policlonal disponible * Detecta virus episomal posibles Problemas con la variación de la Cepa. Posibles problemas con el Antisuero E iniciadores en caso de variación
BSV (integrante activable)	PCR	Específico de la cepa. Depende de la Información sobre la secuencia de la cepa
Otros Virus	Miniprep+EM	Detecta la presencia de los virus con Forma de bastón y unido con el antisuero 0* Detecta virus no reconocido anteriormente. Más difícil con la baja concentración de Los virus isométricos.

* No disponible para la detección comercial

0 Algunos anticuerpos disponibles contra el BDBV

CAPITULO 4

4. EFECTO DE FACTORES ABIOTICOS Y DEL CULTIVO DE TEJIDO SOBRE LA EXPRESION DEL BSV.

Las plantas de banano se desarrollan dentro de ciertos limites de factores abióticos; que inciden en el aumento ó disminución de la expresión del BSV, tales como: la temperatura, los nutrientes, tipo de suelo y agua.

El cultivo de tejido no erradica totalmente la presencia de la partícula viral dentro del meristemo.

4.1 Influencia de la temperatura y precipitación pluvial en condiciones de campo

El virus del Rayado del Banano (BSV), se manifiesta con mayor grado de virulencia cuando existe un desequilibrio nutricional, variaciones de temperatura, déficit o exceso de agua, o situaciones que provocan estrés.

En nuestro país en la época del Niño en 1998, la incidencia de la infección

del BSV fue mayor; por los cambios de temperatura de 18°-36°C.(Personal)

Las investigaciones realizadas por el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA 1998), reportan que los síntomas eran más frecuentes y severos, a temperatura inferior a 22°-24°C, que altas temperaturas (28°-32°C). Existen pocas investigaciones del efecto del Virus del Rayado del Banano sobre el rendimiento de la fruta; entre los cuales tenemos:

- Investigaciones realizadas en Costa de Marfil (20), en el Clon Poyo perteneciente al sub-grupo Cavendish, demuestran una disminución del rendimiento del banano entre el 7 y el 90%.
- En dos plantaciones comerciales de Cavendish (cv Williams) en Australia (9), encuentro infecciones alrededor del 5% de las plantas de esta plantación que estuvo infectada por el BSV. Se menciona el estudio de los efectos de la cepa australiana del BSV sobre el rendimiento de los bananos Cavendish (cv Williams) bajo condiciones locales Queensland (Tabla 8)

TABLA 8
EL EFECTO DE LA INFECCIÓN CON EL BSV SOBRE EL DESARROLLO
DE LAS PLANTAS, RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LA FRUTA,
AUSTRALIA, 1996.

Tratamiento	Desde la siembra Hasta la cosecha (días)	Racimo Peso(Kg)	Peso del Racimo/año (Kg/planta /cm)	% Extra Fruta Grande	Mano 3 Largo del dedo (cm)	Seudotallo Altura (cm)	Seudotallo Circunferencia (cm)
Infectados Con el BSV	376+	22.3	21.6	58,2	24,4	203	48,4
Libre del BSV	355	22.7	23.3	62,2	24,6	205	49,1
Prueba F	*	NS++	*	NS	NS	NS	NS

Los valores mostrados son el promedio de 12 parcelas replicadas. (Diseño de bloque completo al azar 10 muestras de plantas por parcela).

++ Las diferencias no son significativas.

* Significativamente diferente a $P < 0.05$

(Fruta Extra Grande ≥ 23.5 cm de largo)

Estos resultados nos indicaron que la infección del BSV, afectó significativamente en la etapa entre la siembra y la cosecha, que fue retardado por tres semana en plantas infectadas, representando un 7% de reducción del rendimiento por unidad de tiempo. Ningún otro parámetro fue afectado significativamente. Esto implica que el ensayo que se realizó al norte de Queensland, que los factores abióticos (condiciones ambientales, humedad del suelo, fertilidad del suelo), fue óptima, y no afectó en su crecimiento. Sin embargo en condiciones extremas, cuando sufren un estrés las plantas de banano, la infección puede ser mayor.

4.2 Influencia del cultivo de tejido

El cultivo de tejido ayuda que se exprese la forma episomal de las secuencias integradas del BSV. Tanto las secuencias activables (que se exoresan episomalmente) y "no activables" (que no expresan

episomalmente) del BSV que están integrada en el genoma de Musa (5).

El cultivo de meristema no elimina totalmente la presencia del BSV , existiendo una técnica **in vitro** que es la crioconservación, en la parte experimental han logrado la erradicación del BSV un 63 %, están investigando la ubicación específica de las partículas virales del BSV dentro del meristema (15).

El Virus del Mosaico del Pepino (CMV) ha sido saneado a partir del cultivo **in vitro** de puntos meristemáticos por Berg y Bustamante (1974) y Surga (1988), usando plantas del sub - grupo Cavendish AAA. (42).

4.3 Influencia de sustancias antivirales

La aplicación de sustancias reguladoras de crecimiento como el ácido giberélico, ha permitido estimular el crecimiento de las yemas axilares inhibidas por virus en los amarillamiento del cerezo ácido. Se ha aplicado ribavirina en forma de aspersiones disminuyen significativamente los síntomas de algunos virus.

Las hormonas vegetales se clasifican en promotores y inhibidores, pueden ser naturales y sintéticos. Dentro de las hormonas promotoras están: auxinas, giberilinas, citoquininas y los inhibidores ácidos abcíscico. Se expresa como una hipótesis que las células meristemáticas acumulan sustancias de acción antiviral (guanidina) (24).

La aplicación a las plantas con cimetrina los **tratamientos disminuyen**, las lesiones locales del hospedante causada por el virus (1).

CAPITULO 5

5. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación se realizó con muestras foliares e hijuelos de plantas adultas de banano de la variedad Valery, del grupo Cavendish de las unidades de producción. Las muestras fueron analizadas por **microscopía electrónica y mediante ensayos inmunoenzimáticos- ELISA (Anexo 1).**

5.1 Etapas del proceso de desarrollo de la investigación

La investigación tuvo tres etapas:

Etapas 1.- Recolección del material en el campo.

Identificación de las plantas adultas de banano con los síntomas foliares causado por el Virus del Rayado del Banano (BSV), confirmado por prueba serológicas, cuya muestra de tejido vegetal e hijuelos, pertenece a la Agrícola Martinica de la Corporación NOBOA , ubicado en Baba, de la provincia de Los Rios, en 1999.

Etapas 2. Propagación del material vegetativo en laboratorio.

Las muestras de hijuelos obtenidos en la Agrícola Martinica se llevaron a **SEBIOCA** (Sociedad Ecuatoriana de Biotecnología),

ubicada en el Campus La Prosperina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral de la ciudad de Guayaquil.

La propagación **in vitro** de plantas sanas y enfermas, en este trabajo de investigación tiene dos fases de la etapa 2.

Fase 1. Preparación de los medios de cultivo del experimento.

- Se preparó un medio de cultivo común para los pases de subcultivo para obtener las plántulas requeridas.

- Los tratamiento que se utilizó fueron diferentes concentraciones de hormona 6-bencilaminopurina (BAP), polietilen glicol (PEG) en los medios de cultivo a temperatura de 18° C, 26° C y 18° C a 34° C de manera individual, de los cuales se utilizó 840 plántulas, como se indica la figura 7.

Fase 2. Propagación de plántulas in vitro en cantidades suficientes

En la propagación de los meristemas de banano, se realizó diferentes pases de subcultivos (P1, P2, P3, P4, P5), para obtener la cantidad de plántulas sanas y enfermas (presencia del virus) suficiente para la investigación, en lo cual se cumplió las siguientes fases

- Explantación
- Introducción
- Propagación
 - Periodo de estrés
 - Periodo de enraizamiento
 - Periodo de adaptación e invernadero.

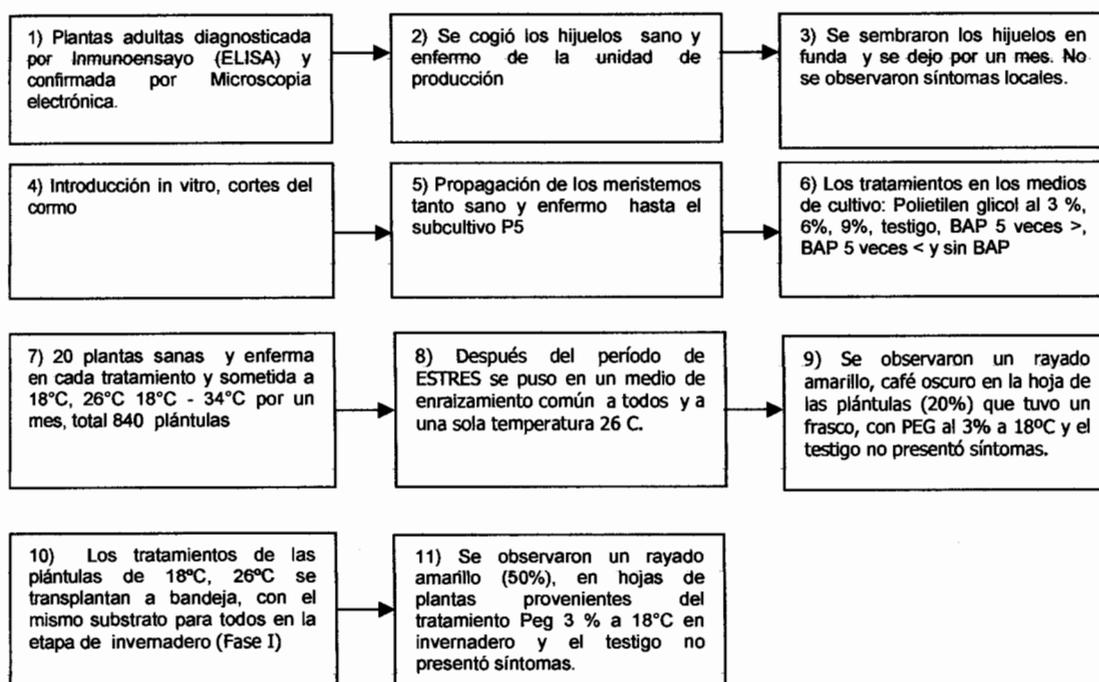


Figura 7. Esquema del proceso de los tratamientos in Vitro

Etapa 3 . Confirmación e identificación de la presencia viral .

Purificación del Virus del Rayado del Banano (BSV), confirmado por Microscopia electrónica de transmisión en el Instituto Higiene Leopoldo Izquieta Pérez de la Ciudad de Guayaquil.

5.2 Preparación de medios de cultivos de banano

El éxito de la preparación de los medios de cultivo se debe entre otros factores a la calidad del agua destilada, limpieza de la cristalería y los reactivos.

A un volumen de 2000 ml de agua bidestilado y se le añade los reactivos que aparecen recogidos en la Tabla 9, el orden A, B, C, D, E, G, J, y se puso inositol, ácido ascórbico, sacarosa-agar. Este medio de cultivo será utilizado en los diferentes pases de subcultivos P1 a P5, hasta obtener las cantidades de plántulas necesarias.

TABLA # 9

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE BANANO

Reactivos	Vol (ml)	pH
A	50	4.76
B	2	4.76
C	20	3.96
D	5.8	3.95
E	2	3.95
G	20	5.54
I	8	5.52
J	10	5.07
Inositol	200 mg	5.07
A. Ascórbico	100 mg	3.99
Sacarosa	60 g	4.03
Agar	4 g	
BAP	8	

Bidestilada pH 5.67 Conductividad. =1.15
(A..J, significa sales minerales, vitaminas, aminoácidos)

5. 2.1 Tratamientos correspondientes a la investigación.

Los tratamientos correspondientes a los medios de cultivo (7), a las diferentes temperaturas (3) y al tipo de plantas, enfermas y sanas (2), ver la tabla 10.

TABLA #10

DISTRIBUCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y TEMPERATURA DEL EXPERIMENTO.

Medios de cultivos 7	T E M P E R A T U R A					
	18° C		26° C		18° C a 34° C	
	Enfermas	Sanas	Enfermas	Sanas	Enfermas	Sanas
1. m1=PEG 1 (3%)	20	20	20	20	20	20
2. m2=PEG 2 (6%)	20	20	20	20	20	20
3. m3=PEG 3 (9%)	20	20	20	20	20	20
4. m4=Sin BAP en el medio	20	20	20	20	20	20
5. m5=5 veces menor /dosis	20	20	20	20	20	20
6. m6=Testigo /dosis normal	20	20	20	20	20	20
7. m7=5 veces mayor /dosis	20	20	20	20	20	20
T O T A L	P L A N T A S					840

5.2.2 Preparación de los medio de cultivo con BAP (6

bencilaminopurina)

Se prepararon 2 litros de solución madre (tabla 11), cogiendo 500 ml de dicha solución para cada concentración de BAP, de acuerdo a la tabla 11. Se aplicó hidróxido de potasio 0.1N para ajustar el pH.

TABLA # 11

DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HORMONA BAP (6-BENCYLAMINOPURINA) EN EL MEDIO DE CULTIVO, Y EL NIVEL DE pH ANTES Y DESPUES DE APLICAR EL HIDROXIDO DE POTASIO 0.1N

Variables	Volumen / 500 ml	pH inicial	PH final
Sin BAP en el medio	0.0- (Omar 1)	4.04	5.8
5 veces menor /dosis	0.4ml (Omar 2)	3.98	5.81
Testigo / dosis normal	2 ml (Omar 3)	3.69	5.8
5 veces mayor / dosis	10 ml (Omar4)	3.07	5.8

5.2.3 Preparación de los medios con PEG (Polietilen glicol)

Se prepararon 2 litros de solución madre, que contiene los reactivo de la tabla 12, se cogió 500 ml para cada una de las concentraciones de PEG, de acuerdo a la tabla 13.

TABLA # 12

ESTE MEDIO DE CULTIVO SE UTILIZÓ EN LOS TRATAMIENTOS DE LOS PEG

Reactivos	Vol (ml)	HP
A	50	4.71
B	2	4.74
C	20	3.81
D	5.8	3.96
E	2	3.82
G	20	5.57
I	8	3.87
J	10	5.30
Inositol	200 mg	4.42
A.Ascórbico	100 mg	3.91
Sacarosa	60 g	5.27
Agar	4 g	
BAP	8	4.2

(A..J, significa sales minerales, vitaminas y aminoácidos)

TABLA # 13

DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PEG (POLIETILEN GLICOL) EN EL MEDIO DE CULTIVO, NIVEL DE pH ANTES Y DESPUES DE APLICAR EL HIDROXIDO DE POTASIO AL 0.1N

Variables	Volumen /500 ml	pH inicial	HP final
PEG 1 al 3 %	15 g	4.21	5.80
PEG 2 al 6%	30 g	4.64	5.81
PEG 3 al 9%	45 g	4.96	5.80

5.3 Propagación in vitro de plantas sanas e infectadas.

5.3.1 Explantación

Se utilizaron hijuelos de unidades de producción que estaban diagnosticadas que tenían BSV (Lockhart B, 1999), plantación tecnificada perteneciente a la Agrícola Martinica, cerca de Baba de la provincia de Los Ríos. Los hijuelos se identificaron y se pusieron en costalillos, y se trasladaron al laboratorio. Luego se procedió a eliminar todo el tejido necrótico y a desinfectarlos con Vitavax, para sembrarlos en fundas, cuyo substrato tenía 25% arena, 50% cachaza y 25% tamo de arroz

En las fundas estuvieron por tres semanas, como se observa en la figura 8 y se aplicó al suelo fertilizante 100 ml. Por fundas (Macro y micro elementos).



Figura 8.- Distribución de los hijuelos con BSV antes de la introducción In Vitro

5.3.2 Introducción in vitro

Se realizaron cortes de hasta 5 cm en los ápices meristemáticos y se colocaron en cloro al 4% por 30 minutos. Luego fueron plantados en un medio de Murashige y Skoog (1962), con ciertas modificaciones (Korneva S, 1999). Luego se procedió a flamear el bisturí, pinza y platillo dentro del flujo laminar, como se observa en la Figura 9, y se realizó el primer corte eliminando el tejido más externo y se dejó 3 minutos en una solución de cloro al 4 %.

El segundo corte se dejó en agua destilada y se enjuagó 4 veces, y en el tercer corte se eliminó aún más tejido sin dañar el meristemo, para sembrarlo en los tubos que contenían medio nutritivo y se cubrió con cinta y se rotuló.

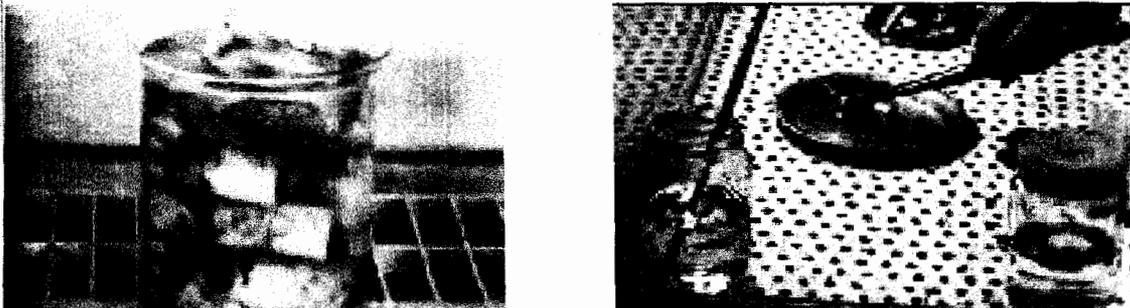


Figura 9. - Fases de la introducción In Vitro: a) primer corte en el ápice meristemático b.) tercer corte para la siembra en los tubos de ensayo

5.3.3 Propagación.

Desde el subcultivo P1-1, los brotes se cortaron por la mitad y se realizó un saneamiento del tejido para luego sembrarlo en los tubos. Los subcultivos se realizaron cada 25 días hasta P5, como se ilustra en la figura 10.



Figura a)



Figura b)



Fig. c)

Figura 10.- Etapas del proceso de propagación a) corte de los brotes laterales; b) siembra de los meristemos; c) pases a p3

5.3.4 Periodo de estrés

Se utilizó los tratamientos de los medios de cultivo, con diferentes concentraciones de BAP, PEG (Tabla 12 y 14) y diferentes temperaturas (18° C, 26° C, 18° C-34° C) por un mes

Los parámetros de crecimiento que se evaluaron en los periodo de estrés, enraizamiento y adaptación. Se realizó promedios de las cuatros plantas de cada frasco de cultivo.

- Área foliar (ancho por largo) de 3 hojas (excepto la hoja bandera).
- Altura desde la base del pseudo tallo hasta la " V " foliar en cm
- Peso de todas las plantas de cada tratamiento en gramos
- Se valora en cruces (XXXX hasta X) el crecimiento radical de cada tratamiento. Los valores son los siguientes

X	0-1 raíz
2X	2-3 raíces
3X	4-5 raíces
4X	6-7 raíces

En la figura 11 podemos observar como el PEG detiene el crecimiento de la plántula a 26° C.



Fig a)



Fig b)



Fig c)

Figura 11. Diferentes concentraciones de peg a 26°C: a) peg al 3%, plantas enfermas; b) peg al 3 %, plantas sanas; c) peg al 9 %, plantas enfermas

5.3.5 Periodo de enraizamiento

En esta etapa de enraizamiento todas las plantas que se sometieron a diferentes tratamientos y temperaturas a 18° C, 26° C con excepción del bloque de 18° C-34° C, que no se recuperaron del estrés, se colocaron en un mismo medio de enraizamiento por un mes en condiciones normales a 26° C, como se ilustra en la figura # 12.



Figura 12.- Plántula en un medio normal de enraizamiento, que proviene de peg del 9 % de 26° C.

5.3.6 Periodo de adaptación e invernadero

En la etapa de adaptación ó bandeja, se utilizó un mismo substrato rico en materia orgánica para todos los tratamientos de 18° C, 26° C en condiciones normales de campo, como se observa en la figura 13



Fig a)

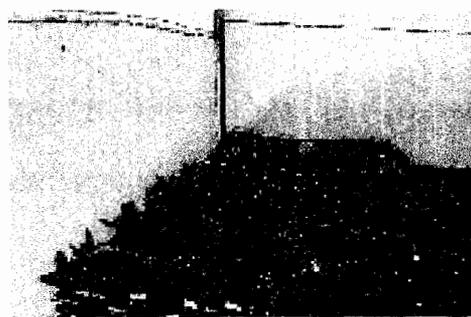


Fig b)

Figura 13.- Distribución de las plántulas en el invernadero: a) Plántulas enfermas del bloque a 18° C; b) Plántulas enfermas (asintomático) del bloque de 18° C y 26° C.

5.4 Toma de las muestras foliar para la purificación.

Para el diagnóstico del BSV se cogió la hoja # 8 de plantas de 6 años de edad de la Agrícola Martinica, que pertenece al cantón Baba de la provincia de Los Ríos, plantadas en condiciones edafoclimáticas buena (Anexo 2)

Se cogió réplicas de muestra foliar, en una plantación tecnificada, las hojas presentaban un rayado amarillo perpendicular a la nervadura central. La muestra foliar se envolvió con papel de filtro y se humedeció con agua bidestilada y luego se puso en una funda plástica, cubierto con hielo dentro de un recipiente.

5.5 Obtención y purificación del virus para el diagnóstico.

El método de obtención y purificación del virus se realizó según lo descrito por Lockhart B. (1986) con algunas modificaciones, como nos indica la figura # 14.

Para extraer el virus de la hoja se pesaron 125g de tejido foliar infectado, y se cortó en pedazos pequeños, se sumergió en 400ml de un tampón de extracción durante 24h a 4° C, que contenía: Tris 0.01M, ajustado con ácido cítrico pH 7.4, se añadió polivinilpirrolidina 1%(PVP), y mercaptoetanol 0.01M. Después se homogenizó durante un minuto por tres veces, añadiendo gradualmente la mezcla de homogenizar. El homogenato se filtró, se llevo a 350mm y se añadió 1/3 volumen de cloroformo (frío a 4° C) y se agitó por un minuto (Anexo 4).

Se centrifugó por 10 minutos a 10.000g. La mezcla se colocó en dos tubos de polipropileno de 250 ml y luego el sobrenadante se dializó

durante 36h, dentro de una membrana (20 micras), amarrándolo por los dos extremos y cubriéndolo con polietilen glicol (PEG) y colocándola dentro de una bandeja hasta concentrar a 100 ml (a 4° C). El sobrenadante concentrado es ultra centrífugo por 1h a 136.000g. El precipitado se congeló a -20° C. Se prepararon placas para microscopía electrónica de transmisión según Jasupi A (2000).

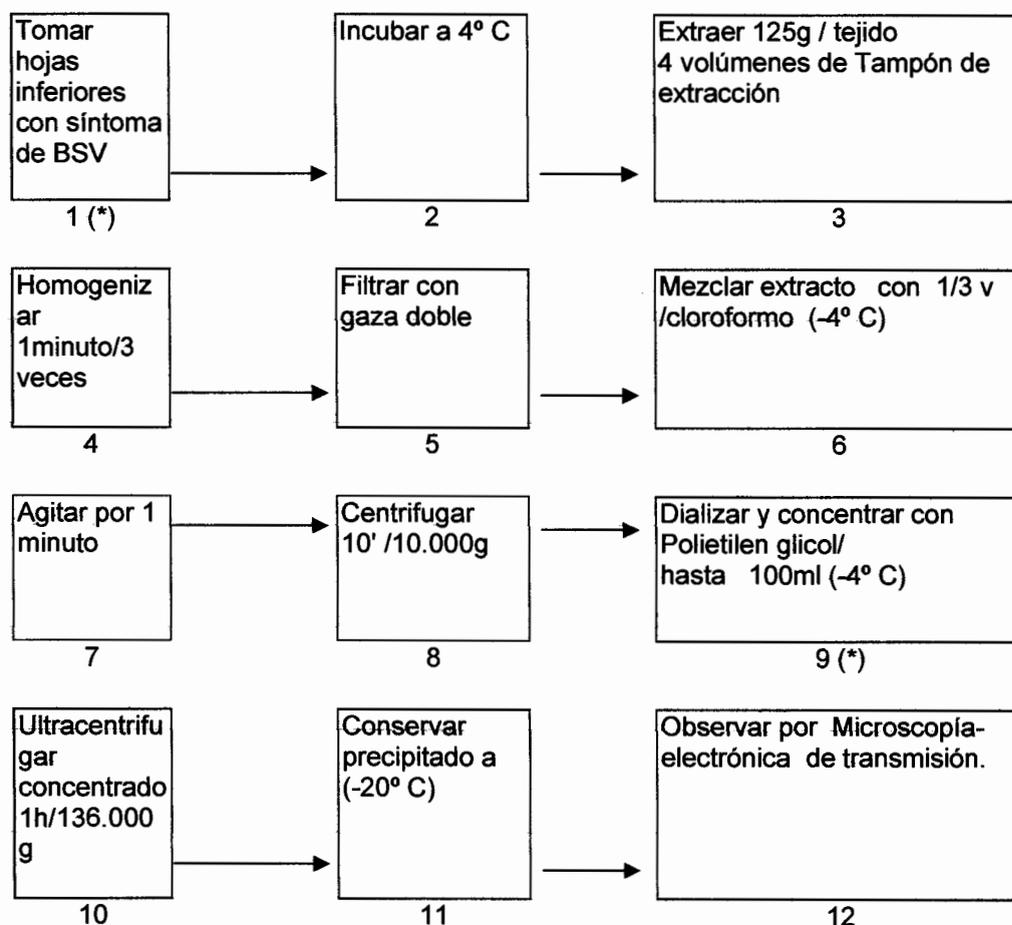


Figura 14.- Metodología de la purificación del virus del rayado del banano (BSV) según descrito por LOCKHART B (1986), con ciertas modificaciones (*)

5.6 Diagnóstico del virus de rayado de banano (BSV) por microscopía electrónica de transmisión

El precipitado obtenido de la centrifugación de color verde, parcialmente purificado se tiñó con tinción negativa al 1% de ácido Fosfotúngstico, de fracciones virales purificadas por CsCl fueron observadas al microscopio electrónico partículas baciliformes de 150 x 30 nm, características del BSV.

CAPITULO 6

6. ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial, 7 (medios de cultivos) x 2 (presencia – ausencia del virus) x 3 (tipo de temperaturas de 18° C, 26° C y 18° C a 32° C)

6.1 Los factores en estudios.

- Medio de crecimiento
- Tipo de planta
- Temperatura de crecimiento

Que corresponden a los 42 tratamientos (7x2x3), asignándose a cada uno 20 plántulas por medios de cultivo, totalizando 840 muestras

6.2 Interacciones presentes.

Además de los efectos individuales para cada factor en estudio, en el presente experimento se analizó el efecto de las siguientes interacciones:

- Medios de cultivo por tipo de planta
- Medios de cultivos por temperatura de crecimiento
- Tipo de planta por temperatura de crecimiento

- Medio ejecutivo por tipo de planta por temperatura de crecimiento

La unidad experimental fue un frasco de cultivo conteniendo cuatro plántulas de banano de las cuales se obtuvo un promedio. Cada una de las cinco observaciones se realizó en cada frasco (4x5=20 plántulas) Las unidades experimentales se ubicaron al azar en las condiciones de crecimiento, debidamente rotuladas para la determinación de las variables en la etapa posteriores del experimento.

6.3 Tratamientos en estudio

Los tratamientos que se evaluaron en el ensayo son los siguientes:

TABLA # 14

Periodo Stress				
Codificación		Tratamientos		
		Medio	Inoculación	Temperatura
1	m1i1t1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	Positivo	18 °C
2	m1i1t2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	Positivo	26 °C
3	m1i1t3	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	Positivo	18 °C - 34 °C
4	m1i2t1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	Negativo	18 °C
5	m1i2t2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	Negativo	26 °C
6	m1i2t3	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	Negativo	18 °C - 34 °C
7	m2i1t1	PEG 2 (6% Polietilen Glicol)	Positivo	18 °C
8	m2i1t2	PEG 2 (6% Polietilen Glicol)	Positivo	26 °C
9	m2i1t3	PEG 2 (6% Polietilen Glicol)	Positivo	18 °C - 34 °C
10	m2i2t1	PEG 2 (6% Polietilen Glicol)	Negativo	18 °C
11	m2i2t2	PEG 2 (6% Polietilen Glicol)	Negativo	26 °C
12	m2i2t3	PEG 2 (6% Polietilen Glicol)	Negativo	18 °C - 34 °C
13	m3i1t1	PEG 3 (9% Polietilen Glicol)	Positivo	18 °C
14	m3i1t2	PEG 3 (9% Polietilen Glicol)	Positivo	26 °C
15	m3i1t3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol)	Positivo	18 °C - 34 °C

16	m3i2t1	PEG 3 (9% Polietilen Glicol)	Negativo	18 °C
17	m3i2t2	PEG 3 (9% Polietilen Glicol)	Negativo	26 °C
18	m3i2t3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol)	Negativo	18 °C - 34 °C
19	m4i1t1	Omar 1(sin BAP)	Positivo	18 °C
20	m4i1t2	Omar 1(sin BAP)	Positivo	26 °C
21	m4i1t3	Omar 1(sin BAP)	Positivo	18 °C - 34 °C
22	m4i2t1	Omar 1(sin BAP)	Negativo	18 °C
23	m4i2t2	Omar 1(sin BAP)	Negativo	26 °C
24	m4i2t3	Omar 1(sin BAP)	Negativo	18 °C - 34 °C
25	m5i1t1	Omar 2(5 veces < la dosis de BAP)	Positivo	18 °C
26	m5i1t2	Omar 2(5 veces < la dosis de BAP)	Positivo	26 °C
27	m5i1t3	Omar 2(5 veces < la dosis de BAP)	Positivo	18 °C - 34 °C
28	m5i2t1	Omar 2(5 veces < la dosis de BAP)	Negativo	18 °C
29	m5i2t2	Omar 2(5 veces < la dosis de BAP)	Negativo	26 °C
30	m5i2t3	Omar 2(5 veces < la dosis de BAP)	Negativo	18 °C - 34 °C
31	m6i1t1	Omar 3 (testigo es la dosis normal)	Positivo	18 °C
32	m6i1t2	Omar 3 (testigo es la dosis normal)	Positivo	26 °C
33	m6i1t3	Omar 3 (testigo es la dosis normal)	Positivo	18 °C - 34 °C
34	m6i2t1	Omar 3 (testigo es la dosis normal)	Negativo	18 °C
35	m6i2t2	Omar 3 (testigo es la dosis normal)	Negativo	26 °C
36	m6i2t3	Omar 3 (testigo es la dosis normal)	Negativo	18 °C - 34 °C
37	m7i1t1	Omar 4(5 veces > la dosis de BAP)	Positivo	18 °C
38	m7i1t2	Omar 4(5 veces > la dosis de BAP)	Positivo	26 °C
39	m7i1t3	Omar 4(5 veces > la dosis de BAP)	Positivo	18 °C - 34 °C
40	m7i2t1	Omar 4(5 veces > la dosis de BAP)	Negativo	18 °C
41	m7i2t2	Omar 4(5 veces > la dosis de BAP)	Negativo	26 °C
42	m7i2t3	Omar 4(5 veces > la dosis de BAP)	Negativo	18 °C - 34 °C

El coeficiente de variación se expresó en porcentaje en toda la variable de estudio y se aplicó el esquema de ADEVA.

Esquema del análisis estadístico.

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total	209
Tratamientos	41
Medios de Cultivo (M)	6
Tipos de Plantas (I)	1
MxI	6
Temperatura (T)	2
MxT	12
IxT	2
MxIxT	12
Error experimental	168

6.4 Análisis funcional

Se realizó en cada una de las variables las siguientes pruebas de significación, como se indica los anexos citados.

- Tukey al 5% para medios de cultivo
- DMS al 5% para tipo de plantas
- Tukey al 5% para temperatura.
- Tukey al 5% para interacciones.

Los parámetros de crecimiento que se evaluaron fueron: 1 área foliar, 2 altura, 3 raíces y 4 peso de las plántulas para cada uno de los periodos de la propagación (estrés, enraizamiento, adaptación). Excepto el bloque 18° C a 34° C en el período de enraizamiento y adaptación.

CAPITULO 7

7. RESULTADOS Y DISCUSION

La sintomatología causado por el BSV en el cultivo de banano se detalla a continuación:

7.1 Descripción de las plantas adulta con síntomas.

Fueron observados en el área foliar síntomas (fig. 15), un rayado amarillo-café oscuro, en las plantas "madre" y lesiones necróticas en la nervadura central, causados por el BSV. Los hijuelos no presentaban síntomas en la hoja, sino después de 3 meses de cultivos en el campo, las estrías características del BSV.



Fig. a)



Fig. b)

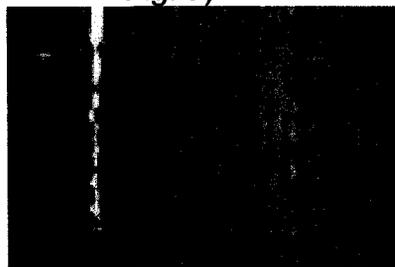


Fig. c)

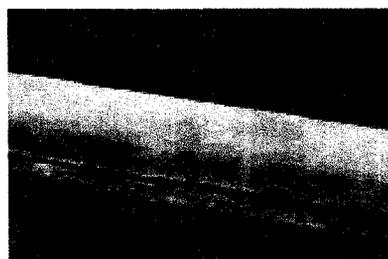


Fig. d)

Figura 15 Síntomas típicos de la enfermedad del BSV en la variedad valery. a) aspecto general de la planta; b) un rayado foliar amarillo causado por el virus; c) un rayado foliar café oscuro; d) lesiones necróticas en la nervadura central de la hoja

7.2 Descripción de los síntomas atípicos.

Se logró observar síntomas poco usuales del Virus del Rayado del Banano, en plantas adultas del clon Valery, tales como el moteado clorótico (fig. 16).



Fig a)

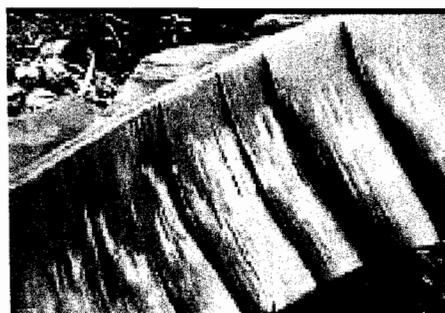


Fig b)

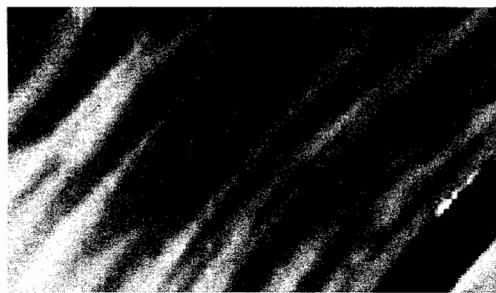


Fig c)

Figura .16 Síntomas atípico del BSV a) los síntomas empiezan desde el borde de la hoja; b) Síntoma locales en las hojas inferiores; c) Un moteado clorótico

7.3 Evaluación de síntomas en hijuelos de plantas madres enfermas

Los hijuelos provenientes de plantas "madre" enfermas, confirmada por ELISA, fueron plantados en las fundas y cultivadas en condiciones controladas para su introducción in vitro, no presentaron síntomas locales en las hojas, como se observa en la figura 17.



Figura 17. Los hijuelos en estado asintomático

7.4 Descripción asintomático en la etapa de propagación.

En los subcultivos in vitro desde P1 hasta P5, en la etapa de propagación no se observaron síntomas locales de plántulas enfermas (fig 18)



Figura 18. Etapa de propagación p2, no presentó síntomas foliares de BSV.

7.5 Valores de crecimientos en la etapa de propagación .

Se evaluaron de las cuatro plantas presentes en cada frasco de cultivo, en las cinco observaciones, de los períodos de estrés, de enraizamiento y de adaptación dieron los resultados siguientes.

Área foliar

- **Período de estrés**

Para la interacción de los tres factores, medios x inoculación x temperatura, (anexo 6), se observó una diferencia notable en el crecimiento vegetativo de las plántulas con mejores respuestas en los tratamientos:

Omar 1 (sin BAP), negativo, 26° C, (m4i2t2)

Omar 1 (sin BAP), positivo, 18° C, (m4i1t1)

Omar 3, (testigo), positivo, 18° C, (m6i1t1)

Los tratamientos que tuvieron casi crecimiento nulo fueron las plantas sometidas a 18° C a 34° C.

Para medios de cultivo, de acuerdo al anexo (7), se observa una mejor respuesta en el crecimiento para los medios de cultivo sin PEG, entre los que sobresale Omar 1 (sin BAP, m4).

En cuanto al efecto de Temperatura, existe alta significación estadística de acuerdo al anexo 6 del análisis de varianza, presentándose mejores resultados de los tratamientos de plántulas sometidas a 26° C y 18° C. Los bloques de 18° C a 34° C tuvieron muy bajo o nulo crecimiento

- **Periodo de Enraizamiento**

De acuerdo al anexo 11, se observó uniformidad en el crecimiento de las hojas para las plántulas sometidas al periodo de estrés 18° C y 26° C. Para el tercer bloque de plántulas de 18° C a 34° C, no se observó crecimiento debido a la contaminación incidental y muerte de las plántulas.

Para los medios de cultivo en este período, de acuerdo al análisis de varianza, no existe significancia estadística, lo que significa que el crecimiento de las plántulas es uniforme.

- **Período de adaptación**

Se observa un mismo patrón de crecimiento con relación al período de enraizamiento, con la no significación estadística en la interacción de medios x inoculación x temperatura, como se observa en el anexo 14 del análisis de varianza.

Para medios de cultivo en este período, de acuerdo al análisis de varianza, existe significancia estadística, los mejores resultados son Omar 1(m4), Omar 2(m5) y Omar 3(m6)

La alta significación estadística para el efecto de la temperatura en este periodo se puede observar en el anexo 15 siendo mayor el efecto estimulante del crecimiento foliar para el bloque de plantas a 26° C.

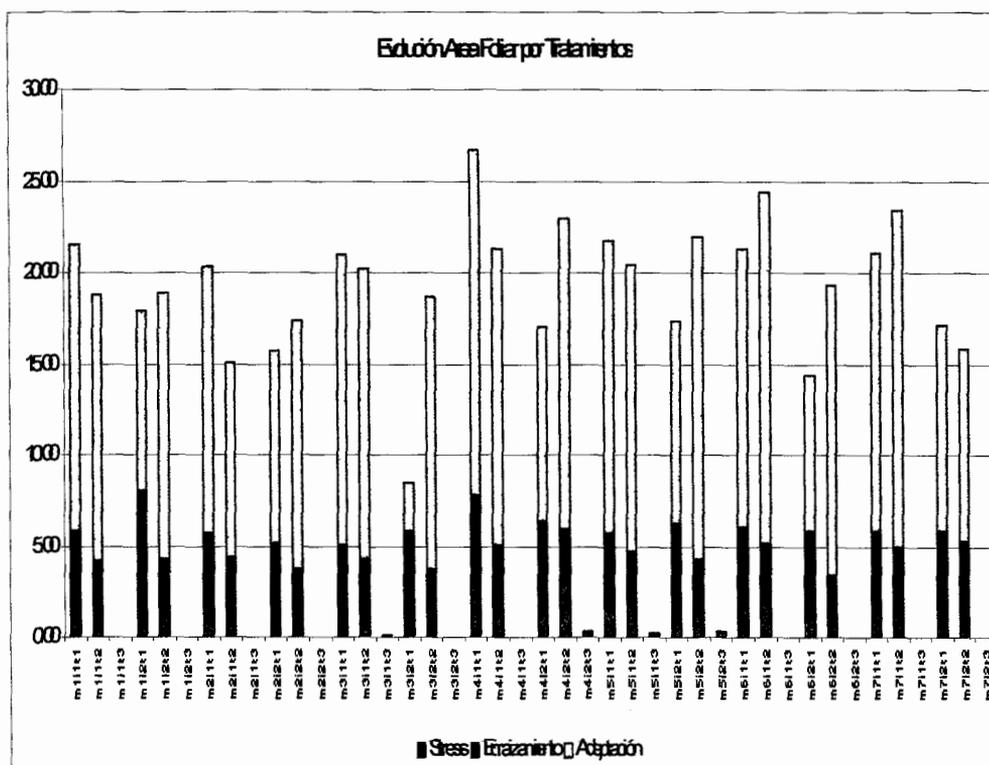


Figura 19.- Evaluación del área foliar en los diferentes períodos de crecimiento.

Altura

- **Periodo de estrés**

De acuerdo al anexo 17, el análisis de varianza se observa significancia estadística para la interacción Medios x Inoculación x Temperatura. Los mejores resultados se presentan para el tratamiento Omar 1 (sin BAP, m4i1t1), positivo, 18° C, seguido por Omar 1 (sin BAP, m4i1t2), positivo, 26° C., Omar 3 (testigo, m6i1t1), positivo a 18° C, Omar 1 (sin BAP, m4i2t1) Las plántulas sometidas a temperaturas consecutivas de 18° C a 34° C presentan los más bajos valores de crecimiento (figura 20).

Para el efecto de medios de cultivo, el análisis de varianza correspondiente arroja alta significación estadística, con un mayor efecto de crecimiento para el medio de cultivo Omar 1 (sin BAP), seguido por Omar 2. En cuanto a los medios con polietilen glicol, PEG 3 presenta el más bajo crecimiento, anexo18

El efecto de la temperatura es altamente significativo para este período. se presenta un mejor crecimiento para las plántulas sometidas a 18 y 26° C anexo18, compartiendo un mismo rango de significación estadística.

- **Periodo de enraizamiento**

De acuerdo al análisis de varianza el anexo 22, no existe significancia estadística para la interacción medios x inoculación x temperatura.

Para medios de cultivo, no existe significación estadística, de acuerdo al análisis de varianza.

- **Periodo de adaptación**

De acuerdo al análisis de varianza en el anexo 24, no existe significación estadística para la interacción de medios x inoculación x temperatura.

Existe alta significación estadística para medios de cultivo, presentándose un mayor efecto en la altura para Omar 2(m4), Omar 1(m5) y Omar 3(m6).

Para el efecto de temperatura no existe significación estadística en este período de adaptación (endurecimiento en bandejas). Se observa un mayor crecimiento vegetal (área foliar, altura, peso) para todos los tratamientos en el período de adaptación en comparación a los períodos previos de cultivo in vitro.

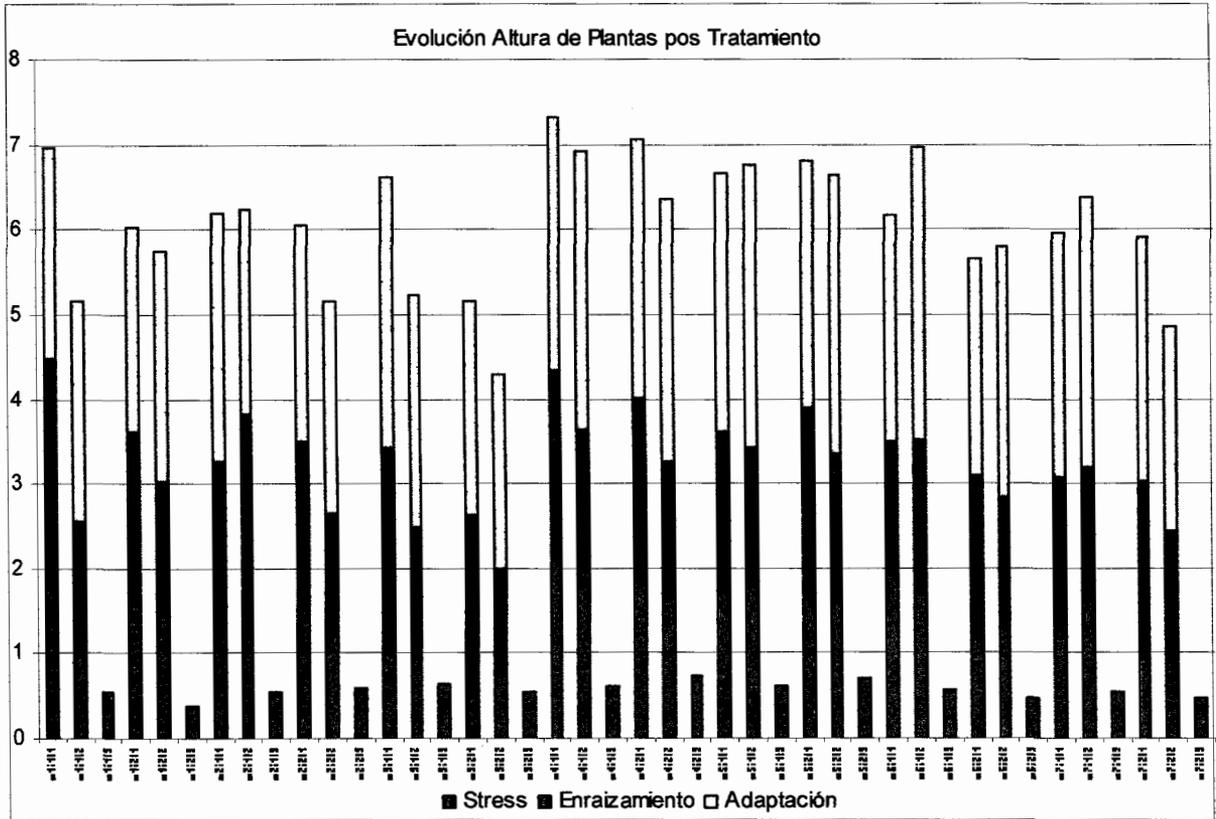


Figura 20.- Crecimiento de altura de las plantas por los tratamientos en los diferentes períodos

Peso

- **Periodo de estrés**

La interacción de medios x inoculación x temperatura arroja una no-significancia estadística.

Para medios de cultivo, existe alta significancia estadística, observado en el análisis de varianza, anexo 27. El mejor efecto se presenta para Omar 1, Omar 2 y Omar 3. El medio de cultivo que tuvo menor efecto en peso de plántula fue **PEG 3** (figura21)

El efecto de temperatura es altamente significativo, presentando un mayor peso las plántulas del bloque de 18° C. La diferencia de peso entre el promedio de plántulas del bloque de 18° C versus las del bloque de 26° C es de 0.08 gramos.

- **Periodo de enraizamiento.**

De acuerdo al análisis de varianza el anexo 31, nos indica que las interacciones medios x inoculación x temperatura no presenta significación estadística.

Para medios de cultivo, en el mismo cuadro, se observa alta significancia estadística, con un mejor efecto en los medios **Omar 1, Omar 2 y Omar 3**; y un menor efecto de peso en PEG 3.

Se observó que las plantas sanas tienen mayor peso que las enfermas a 18° C y 26° C, para los medios de cultivo con PEG. Para los medios hormonales, las plantas sanas presentan un mayor peso que las enfermas a 18° C.

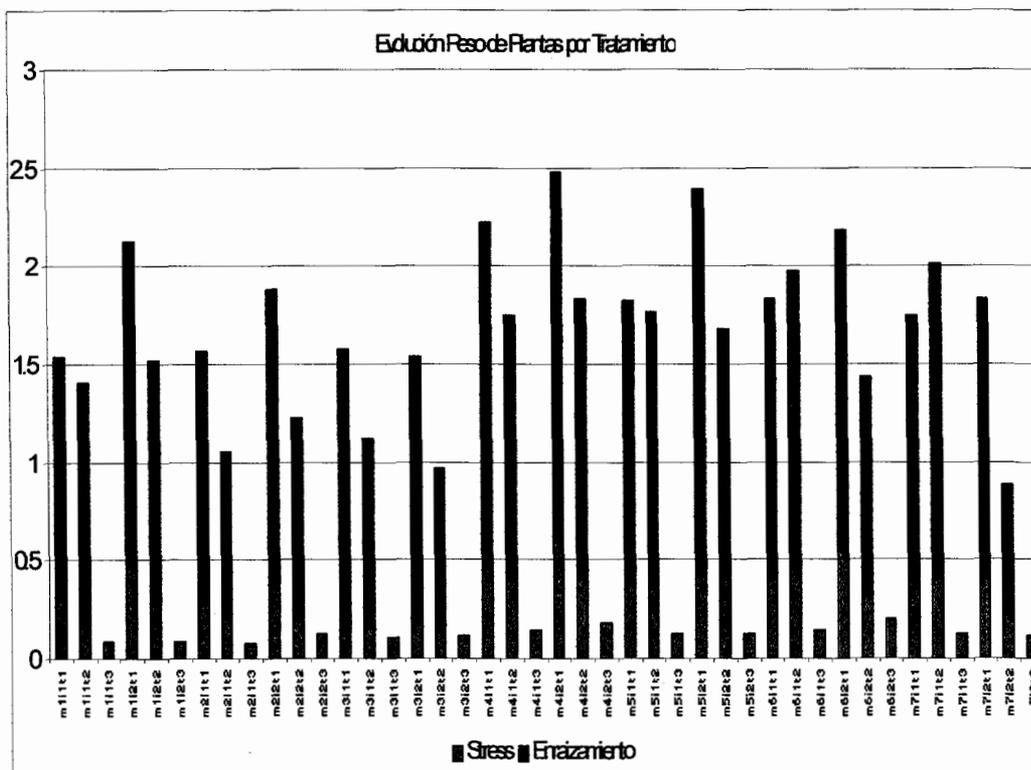


Figura 21. Datos de crecimiento de peso de plantas por los tratamientos en los diferentes periodos

Crecimiento radicular

Periodo de estrés.

De acuerdo al anexo 33 de los tratamientos con mayor concentración hormonal presentan menor cantidad de raíces, mientras que los tratamientos Omar 1 y Omar 2 son los que presentan un mayor crecimiento radicular.

Dentro del grupo de plántulas con los medios de cultivo Omar 1 y Omar 2, no hay crecimiento radicular para las plántulas del bloque 18° C a 34° C, y **el mayor crecimiento** se presenta en el bloque de **plántulas de 26° C.**

Dentro del grupo de plántulas con PEG, un menor crecimiento radicular son aquellas que **crecieron en PEG 3**, como se observa la figura 22.

Las altas temperaturas inactivan algunos sistemas enzimáticos y aceleran otros, lo cual ocasionan reacciones bioquímicas anormales y la muerte de la célula, rompimiento de la membrana citoplasmática y liberación de productos tóxicos en la célula.

Altas concentraciones de Polietilen glicol afectan el crecimiento vegetativo de las plántulas, esto incide en el desarrollo mediante la eliminación de agua de las células vegetales , presentando para todas las temperaturas a las cuales fueron sometidas

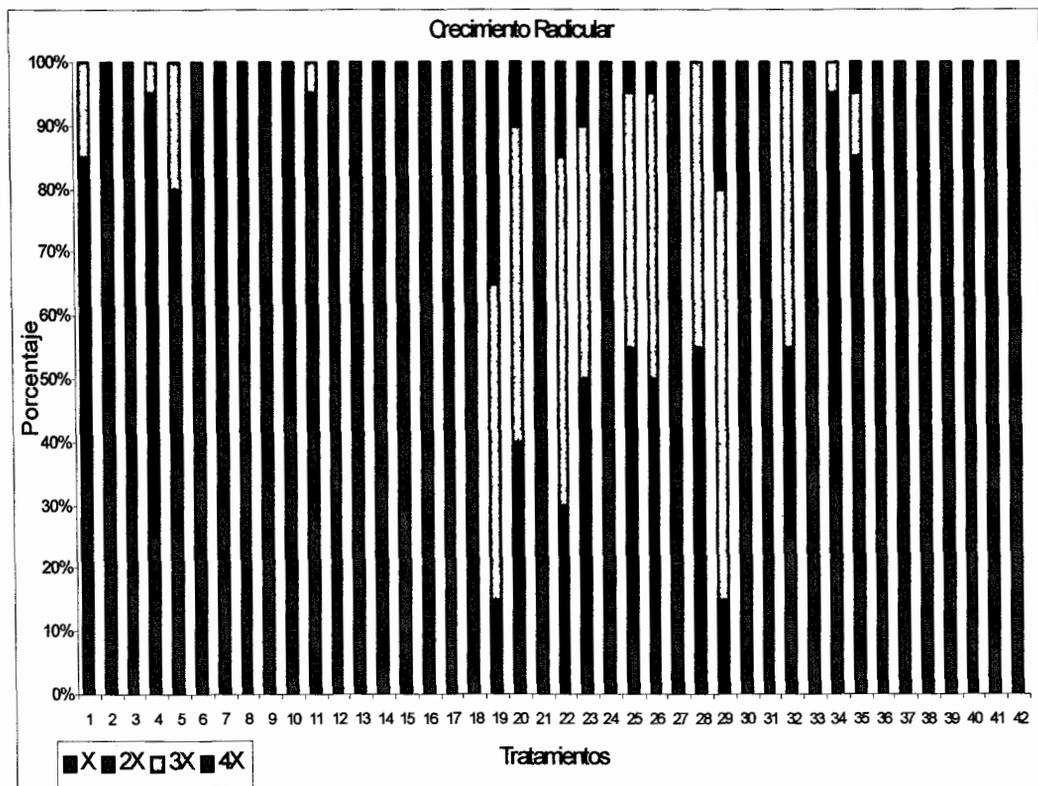


Figura 22.- Distribución del crecimiento radicular por los tratamientos en el periodo de estrés:

- Periodo de enraizamiento

De los resultados presentados en el anexo 34, se observa (figura 23) un mayor crecimiento radicular en el bloque de plántulas provenientes del crecimiento a 26° C, existió una recuperación satisfactoria en los tratamiento que tuvieron PEG, después de ponerlo en el medio de enraizamiento. Con una alta concentración hormonal (Omar 7), el crecimiento radicular es mucho menor.

Se observó una recuperación del sistema radical y foliar de las plántulas estresadas por PEG, al ser transplantadas a un medio de enraizamiento y temperatura no estresante

En cuanto al efecto hormonal en el crecimiento de las plántulas de banano, el mejor resultado en general se presenta para Omar 1 (sin BAP). Esto confirma la metodología normalmente utilizada en el cultivo in vitro, la que menciona la necesidad de utilizar BAP en el medio de multiplicación In Vitro para inducir la dominancia lateral: ahijamiento. El efecto residual de alta concentraciones de BAP en el medio de cultivo de enraizamiento reducen el crecimiento radicular

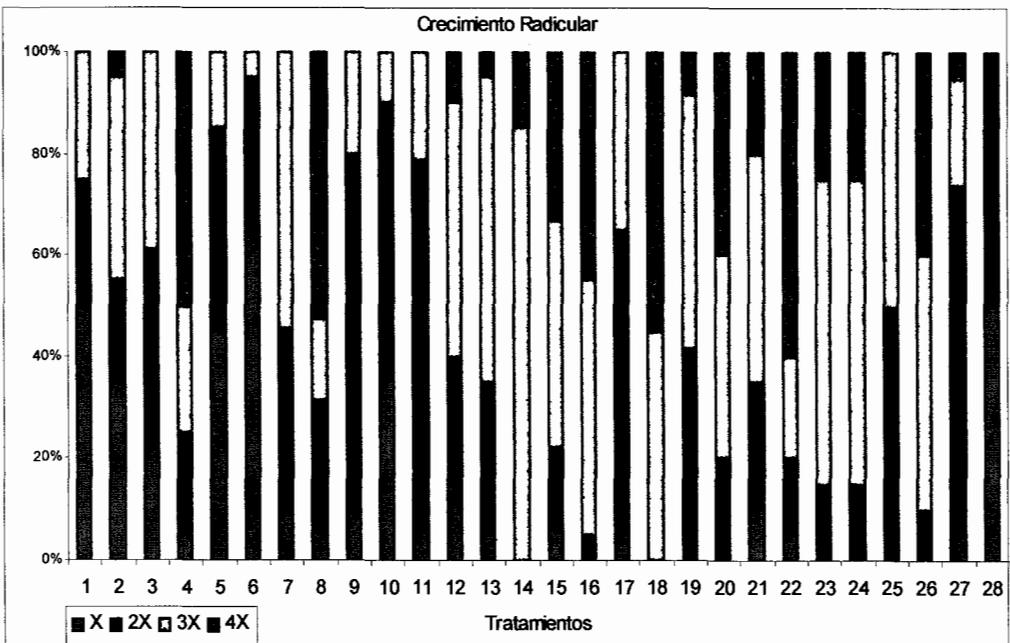


Figura 23. Distribución del crecimiento radicular por los tratamientos en el período de enraizamiento.

7.6 Vitro plantas con síntomas precoz en el periodo de enraizamiento.

Se observó un rayado amarillo en las hojas de las plántulas en un frasco que provino del tratamiento PEG 1 a 18° C, como se ilustra en la figura 24, mientras que en los otros tratamientos no se observó ninguna sintomatología.



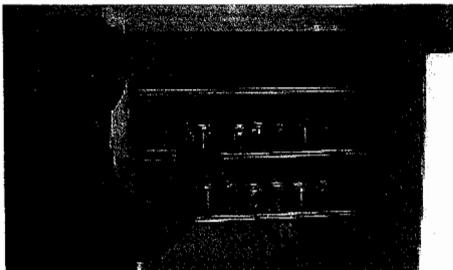
Fig a)



Fig b)

Figura 24. Cultivo In Vitro en condiciones de estrés. a) plántulas del tratamiento de peg 1 al 3% a 18° C un rayado amarillo-café en la hoja, b)testigo.

- Plántulas de meristemas sometidas a 38° C por mas de 8 días en el Fitotrom se mueren (figura 25).



a)



b)

Figura 25.- Plántulas sometidas a 38° C. a) fitotron; b) tejido vegetal muerto.

7.7 Plántulas con síntomas en la etapa de invernadero

- Las plántulas provenientes de los tratamientos de 18° C, 26° C, se observó, a la edad 2 semanas de sembrados en el substrato, en el bloque de 18° C con Polietilen glicol al 3% de las 10 de 20 plantas, que fueron sometidas en el período de estrés, presentaban síntomas (figura 26). El resto de los tratamientos no presentó síntomas. El virus tiene la particularidad de ser asintomático.

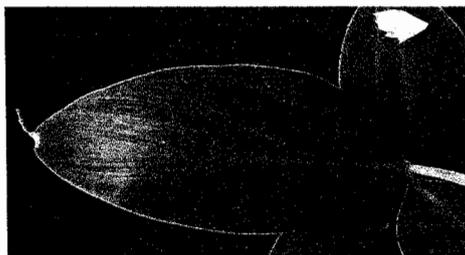


Fig a)



Fig b)

Figura 26.- Plántulas con síntomas precoz del BSV en la etapa de invernadero. a) un rayado amarillo en las hojas; b) testigo.

7.8 Síntomas de variación somaclonal

Tipo variegado que se puede confundirse con virosis (figura 27). Es importante realizar una selección rigurosa, para evitar la siembra de este material meristemático, que no reúne la calidad para el mercado de exportación.



Figura 27.- Plantas de variación somaclonal: a) tipo variegado fase II, 3 semanas ; b) testigo, fase I, 2 semanas.

7.9 Confirmación por microscopía electrónica.

La presencia viral en el tejido foliar de la planta adulta se confirmó con la observación de las partículas virales por Microscopía Electrónica de Transmisión. La imagen nos indica una forma baciliforme (figura 28).



Figura 28.- Partículas virales baciliformes del virus del rayado del banano (BSV).

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenido en la investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

8.1 Plantas adulta de banano con síntomas foliares causado por el BSV.

Los síntomas diferenciales de plantas adultas enfermas en el campo fueron el rayado amarillo que se torna en café oscuro y la presencia de lesiones necróticas en las nervaduras de las hojas inferiores y un moteado clorótico en el área foliar. Esto síntomas permiten diferenciar el BSV de otras enfermedades

8.2 Los efectos del estrés térmico, hídrico y hormonal en plántulas juveniles.

Se observó que existe un crecimiento vegetativo heterogéneo de las plantas sanas y enfermas en el periodo de estrés de los tratamientos previos in vitro de 18° C y 26° C. La presencia de concentraciones mayores de PEG de 6% y 9% disminuye el crecimiento vegetativo in vitro. En el periodo de enraizamiento y adaptación las plántulas se recuperaron significativamente.

8.3 Plántulas con síntoma precoz de cultivo de tejido.

Las plántulas enfermas en condiciones de cultivo in vitro presentaron síntomas de la enfermedad en un 20 %, cuando fueron sometidas al estrés combinado de frío y estrés hídrico. Estos síntomas aumentaron a un 50 %, cuando las plántulas fueron transplantadas y cultivadas en el invernadero, se observó que los síntomas resultaron semejantes a las que se presentan en plantas adultas enfermas con el BSV presencia de un rayado amarillo en las hojas.

8.4 Comprobación de la partícula viral en las hojas de banano

Por primera vez en el Ecuador se logró el aislamiento, purificación por ultracentrifugación en CsCl y caracterización por microscopía electrónica, de un virus de planta, realizado mediante modificaciones exitosas del protocolo descrito por (Lockhart, 1986).

RECOMENDACIONES

- Difundir en la práctica agrícola bananero los síntomas descrito en este trabajo que permiten diferenciar el BSV de otras enfermedades.
- Introducir en la práctica de la micropagación comercial de banano el diagnóstico precoz establecido para plántulas en la fase de endurecimiento en invernadero.
- Descifrar los mecanismos moleculares que inducen la aparición de los síntomas de la enfermedad del BSV, cuando las plántulas son sometidas al estrés combinado de frío e hídrico.
- Basado en el diagnóstico diferencial visual establecido para, plantas adultas, monitorear la presencia de la enfermedad y erradicar las plantas enfermas.

ANEXOS

ANEXO 1

PRUEBA DE ELISA

POR LORCKHART B.

January 25, 1999
MEMORANDUM

TO: Juan Aguirre M.
Exportadora Bananera Noboa S.A.
Guayaquil, Ecuador

FROM: H.E. Lockhart *H.E. Lockhart*
University of Minnesota

SUBJECT: Indexing of plantain leaf samples by ISEM

Dear Sr. Aguirre:

As mentioned in my previous message giving the results of the ELISA indexing of the 44 plantain leaf samples, I decided to re-check 12 samples which had suspiciously high ELISA readings. These samples were indexed by ISEM using partially-purified extracts. The results are as follows.

Samples testing positive for BSV by ISEM

MAR 9, MAR 8, MAR 11, MAR 12, MAR 101, MAR 105, MAR 320, MAR 321

Samples testing negative for BSV by ISEM

MAR 322, CLE 4, CLE 10, CLE 11

Jan 15, 1999. TAS-ELISA indexing of plantain leaf samples from Exportadora Bananera Noboa S.A.,

Guayaquil, Ecuador. Absorbance values (A405) represent the average of 4 replicate wells per sample.

Sample #	Designation	Absorbance (A405)		ELISA Result
		1 st Reading	2nd Reading	
1	AL-1	0,043	0,083	-
2	AL-2	0,029	0,059	-
3	AL-3	0,036	0,069	-
4	AL-4	0,031	0,064	-
5	AL-5	0,038	0,065	-
6	AL-6	0,028	0,057	-
7	AL-7	0,041	0,072	-
8	AL-8	0,044	0,08	-
9	AL-9	0,04	0,071	-
10	AL-10	0,024	0,052	-
11	MAR-101	0,073	0,142	?
12	MAR-102	0,03	0,062	-
13	MAR-103	0,045	0,084	-
14	MAR-104	0,163	0,319	+
15	MAR-105	0,078	0,149	?
16	MAR-106	0,041	0,08	-
17	MAR-27	0,039	0,065	-
18	MAR-8	0,058	0,112	?
19	MAR-9	0,051	0,105	?
20	MAR-10	0,038	0,068	-
21	MAR-11	0,06	0,101	?
22	MAR-12	0,068	0,138	?
23	MAR-313	0,035	0,063	-

Sample #	Designation	Absorbance (A405)		ELISA Result
		1 st Reading	2nd Reading	
24	MAR-314	0,032	0,064	-
25	MAR-15	0,038	0,076	-
26	MAR-16	0,036	0,075	-
27	MAR-312	0,029	0,065	-
28	MAR-318	0,025	0,061	-
29	MAR-319	0,043	0,085	-
30	MAR-320	0,063	0,105	?
31	MAR-321	0,06	0,11	?
32	MAR-322	0,093	0,177	?
33	CLE-1	0,039	0,07	-
34	CLE-2	0,047	0,09	-
35	CLE-3	0,038	0,077	-
36	CLE-4	0,048	0,094	?
37	CLE-5	0,024	0,051	-
38	CLE-6	0,028	0,052	-
39	CLE-7	0,027	0,05	-
40	CLE-8	0,03	0,052	-
41	CLE-9	0,028	0,046	-
42	CLE-10	0,043	0,087	-
43	CLE-11	0,069	0,111	?
44	CLE-12	0,034	0,073	-
45	Healthy Control	0,03	0,064	-
46	BSV Control	0,318	0,0542	+

ANEXO 2**DATOS METEOEREOLOGICOS (PROMEDIOS)****1959-1999****ESTACION BABAHOYO**

D A T O S	ANUAL
Temperatura máxima. (° C)	36.6
Temperatura mínima. (° C)	16.0
Humedad relativa media	82.0
Precipitación (mm)	1710.9
Precipitación máxima (mm)	5172.2
Heliofania (horas /año)	965.6
Viento velocidad media (m/s)	1.0

ANEXO 3

Propagación in vitro de plantas sanas e infectadas

EQUIPOS

- Hielos
 - Fundas
 - Bandeja
 - Flujo laminar
 - Bisturí
 - Pomos
 - Papel de aluminio
 - Papel crac
 - Bioestilador a 400 D
 - Refrigeradora
 - Vasos de precipitación
 - Agitador (termalyne)
 - Peachimetro, meter 320 (corning)
 - Conductimetro, Suntex SC-170
 - Diques
- Autoclave Market Forge STME
 Balanza técnica: Scartories Bp 1200g d: 0.01g
 Balanza analítica. AB104 máx. 101g mín. 10mg
 Aire acondicionado y fitotrom

EACTIVOS

- Vitavax.
 Substracto (cachaza, arena, tamo: 2:1:1).
 Basamid.
 Nitrato de potasio 3g/L
 Sulfato de amonio 1.5 g/L.
 Polyfeed 3g/L
 Cloroformo 4%
 Inositol
 Acido ascórbico
 Sacarosa
 Agar
 Agua biestilada
 Polietilen glicol
 BAP (Bencilaminopurina)
 Identificar nombre A, B, C, D, E, G, I y J (macroelementos, microelementos, vitaminas)

ANEXO 4**PURIFICACION DEL BSV****EQUIPOS**

- Vasos
- Agitador
- Embudos
- Membrana de diálisis
- Papel filtro
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Micropipetas
- Tijera
- Funda
- Guantes
- Balanza (M1-300. CAP. MAX. 310g, Marca chyo).
- Licuadora (Oster).
- Agitador (Mag-Mixer, type MH-61, máx 300, Tokio, Japón).
- Estufa (THELCO Scientific).
- Centrifuga (automatic High Speed refrigerated centrifuge HITACHI SCR 208, ROTOR RPR9-260, RPM=8500)
- Ultracentrifuga (Automatic Preparative Ultracentrifuge, HITACHI SSP-72, ROTOR, RP 65T-627, RPM=65000).
- Refrigerador (Sanyo Medicool MPR-311DR).
- Peachimetro (Modelo 15 accumet).

EACTIVOS

- Triton x-100
- Cloroformo
- Acido citrico
- Tris 0.05M
- Mercaptaetanol 0.01M
- Polivinilpirrolidona 1%
- Agua bidestilada

ANEXO 5

AREA FOLIAR DEL PERIODO DE ESTRÉS (PROMEDIOS DE LAS 4 PLANTULA DE CADA FRASCO, DE LOS TRATAMIENTOS A 18°C, 26°C, 26°C, 18°C-34°C)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Obs.	m11t1	m11t2	m11t3	m12t1	m12t2	m12t3	m21t1	m21t2	m21t3	m22t1	m22t2	m22t3	m31t1	m31t2	m31t3	m32t1	m32t2	m32t3	m41t1	m41t2	m41t3	m42t1
1	1,96	0,81	0,00	1,07	0,64	0,00	0,84	1,54	0,00	0,00	0,97	0,00	0,69	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	3,02	2,33	0,11	0,32
2	0,85	0,34	0,00	0,75	1,32	0,00	0,90	0,92	0,00	0,00	1,28	0,00	0,29	0,54	0,00	0,00	0,73	0,00	3,42	2,02	0,00	1,91
3	1,08	0,73	0,00	0,77	2,26	0,00	0,94	0,73	0,00	0,22	2,46	0,00	0,50	0,42	0,38	0,00	0,62	0,00	2,05	0,79	0,00	0,91
4	1,27	0,51	0,00	1,22	1,48	0,00	1,51	0,63	0,00	0,00	0,02	0,00	0,22	0,37	0,00	0,00	0,86	0,00	3,06	0,90	0,00	1,95
5	0,73	0,48	0,00	1,30	1,86	0,00	0,87	0,23	0,00	0,00	0,48	0,00	0,30	0,51	0,00	0,00	0,65	0,00	2,92	0,38	0,00	1,77
Σ Trat	5,89	2,87	0,00	5,13	7,56	0,00	5,05	4,06	0,00	0,22	5,21	0,00	2,01	2,50	0,38	0,00	2,86	0,00	14,47	6,41	0,11	6,87
x Trat	1,18	0,57	0,00	1,03	1,51	0,00	1,01	0,81	0,00	0,04	1,04	0,00	0,40	0,50	0,08	0,00	0,57	0,00	2,89	1,28	0,02	1,37

	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	Σ Total x Total
Obs.	m42t2	m42t3	m51t1	m51t2	m51t3	m52t1	m52t2	m52t3	m61t1	m61t2	m61t3	m62t1	m62t2	m62t3	m71t1	m71t2	m71t3	m72t1	m72t2	m72t3	
1	4,18	0,16	1,53	2,11	0,24	1,50	0,41	0,39	2,40	1,43	0,00	1,12	0,92	0,00	0,91	1,57	0,00	0,81	0,89	0,00	
2	2,55	0,54	1,27	1,28	0,31	0,71	1,23	0,36	1,41	2,37	0,00	0,51	1,52	0,00	0,78	1,17	0,00	0,89	0,91	0,00	
3	3,18	0,23	2,30	1,45	0,19	0,90	1,60	0,20	2,06	1,98	0,00	0,92	0,00	0,00	1,83	1,64	0,00	0,31	0,96	0,00	
4	2,51	0,31	1,33	1,28	0,00	0,93	0,97	0,48	2,43	1,88	0,00	1,51	1,09	0,00	1,21	1,23	0,00	1,56	0,00	0,00	
5	2,28	0,33	1,86	2,45	0,37	1,32	2,11	0,20	1,83	1,47	0,00	0,96	0,41	0,00	1,87	1,14	0,00	0,32	0,00	0,00	
Σ Trat	14,70	1,57	8,29	8,57	1,11	5,36	6,32	1,63	10,14	9,11	0,00	5,03	3,93	0,00	6,59	6,74	0,00	3,90	2,76	0,00	167,3
x Trat	2,94	0,31	1,66	1,71	0,22	1,07	1,26	0,33	2,03	1,82	0,00	1,01	0,79	0,00	1,32	1,35	0,00	0,78	0,55	0,00	0,80

ANEXO 6

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL ÁREA FOLIAR DEL PERÍODO DE ESTRÉS

F de V	GL	SC	CM	Fcal	
Total	209	150,76			
Tratamientos	41	123,31	3,01	18,41	**
Medio	6	28,4	4,73	28,97	**
Inoculación	1	2,15	2,15	13,16	**
M x I	6	4,85	0,81	4,94	*
Temperatura	2	55,84	27,92	170,85	**
M x T	12	12,05	1	6,15	**
I x T	2	7,63	3,82	23,35	**
M x I x T	12	12,39	1,03	6,32	**
E. Exp.	168	27,45275	0,16		
Gpromedio =	0,8				
CV % =	50,73				

ANEXO 7

PRUEBA DE SIGNIFICACION DEL AREA FOLIAR EN EL PERIODO DE ESTRES

Tukey al 5% para Medios de Cultivo

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4	Omar 1(sin K. BAP)	1,47	a
m5	Omar 2(5 veces menor BAP)	1,04	b
m6	Omar 3 (testigo)	0,94	bc
m1	PEG 1 (3% Polygthylene Glycol)	0,71	cd
m7	Omar 4(5 veces mayor.BAP)	0,67	cde
m2	PEG 2 (6%Polygthylene Glycol)	0,48	de
m3	PEG 3 (9% Polygthylene Glicol)	0,26	f

DMS al 5% para Inoculación

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i1	Positivo	0,90	a
i2	Negativo	0,70	b

Tukey al 5% para Mxl

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4 i2	Omar 1(sin K. BAP) + Negativo	1,54	a
m4 i1	Omar 1(sin K. BAP) + Positivo	1,40	a
m6 i1	Omar 3 (testigo) + Positivo	1,28	ab
m5 i1	Omar 2(5 veces menor BAP) + Positivo	1,20	ab
m7 i1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + Positivo	0,89	bc
m5 i2	Omar 2(5 veces menor BAP) + Negativo	0,89	bc
m1 i2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + Negativo	0,85	bcd
m2 i1	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) + Positivo	0,61	cde
m6 i2	Omar 3 (testigo) + Negativo	0,60	cde
m1 i1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + Positivo	0,58	cde
m7 i2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + Negativo	0,44	cde
m2 i2	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) + Negativo	0,36	de
m3 i1	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) + Positivo	0,33	e
m3 i2	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) + Negativo	0,19	e

ANEXO 8

Tukey al 5% para Temperaturas

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
t2	26 °C	1,19	a
t1	18 °C	1,13	a
t3	18 °C - 34 °C	0,07	b

Tukey al 5% para MxT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4 t1	Omar 1(sin K. BAP) + 18 °C	2,13	a
m4 t2	Omar 1(sin K. BAP) + 26 °C	2,11	a
m6 t3	Omar 3 (testigo) + 18 °C - 34 °C	1,52	ab
m5 t3	Omar 2(5 veces menor BAP) + 18 °C - 34 °C	1,49	ab
m5 t2	Omar 2(5 veces menor BAP) + 26 °C	1,37	b
m6 t1	Omar 3 (testigo) + 18 °C	1,30	b
m1 t1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + 18 °C	1,10	bc
m7 t1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + 18 °C	1,05	bc
m1 t2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + 26 °C	1,04	bc
m7 t2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + 26 °C	0,95	bc
m2 t3	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) + 18 °C - 34 °C	0,93	bcd
m3 t1	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) + 18 °C	0,54	cde
m2 t2	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) + 26 °C	0,53	cde
m5 t1	Omar 2(5 veces menor BAP) + 18 °C	0,27	de
m3 t3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) + 18 °C - 34 °C	0,20	e
m4 t3	Omar 1(sin K. BAP) + 18 °C - 34 °C	0,17	e
m3 t2	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) + 26 °C	0,04	e
m1 t3	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + 18 °C - 34 °C	0,00	e
m2 t1	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) + 18 °C	0,00	e
m6 t2	Omar 3 (testigo) + 26 °C	0,00	e
m7 t3	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + 18 °C - 34 °C	0,00	e

ANEXO 9

Tukey al 5% para IxT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i1 t1	Positivo + 18 °C	1,50	a
i1 t2	Positivo + 26 °C	1,24	b
i2 t2	Negativo + 26 °C	1,15	b
i2 t1	Negativo + 18 °C	0,76	c
i2 t3	Negativo + 18 °C - 34 °C	0,09	d
i1 t3	Positivo + 18 °C - 34 °C	0,05	d

Tukey al 5% para MxlxT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4i2t2	Omar 1(sin K. BAP) Negativo 26 °C	2,94	a
m4i1t1	Omar 1(sin K. BAP) Positivo 18 °C	2,89	a
m6i1t1	Omar 3 (testigo) Positivo 18 °C	2,03	ab
m6i1t2	Omar 3 (testigo) Negativo 26 °C	1,82	bc
m5i1t2	Omar 2(5 veces menor BAP) Negativo 26 °C	1,71	bcd
m5i1t1	Omar 2(5 veces menor BAP) Positivo 18 °C	1,66	bcde
m1i2t2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Negativo 26 °C	1,51	bcde
m4i2t1	Omar 1(sin K. BAP) Positivo 18 °C	1,37	bcdef
m7i1t2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Negativo 26 °C	1,35	bcdef
m7i1t1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Positivo 18 °C	1,32	bcdef
m4i1t2	Omar 1(sin K. BAP) Negativo 26 °C	1,28	bcdefg
m5i2t2	Omar 2(5 veces menor BAP) Negativo 26 °C	1,26	bcdefg
m1i1t1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C	1,18	bcdefgh
m5i2t1	Omar 2(5 veces menor BAP) Positivo 18 °C	1,07	cdefghi
m2i2t2	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) Negativo 26 °C	1,04	cdefghi
m1i2t1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C	1,03	cdefghi
m2i1t1	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) Positivo 18 °C	1,01	cdefghi
m6i2t1	Omar 3 (testigo) Positivo 18 °C	1,01	cdefghi
m2i1t2	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) Negativo 26 °C	0,81	defghij
m6i2t2	Omar 3 (testigo) Negativo 26 °C	0,79	efghij
m7i2t1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Positivo 18 °C	0,78	efghij
m1i1t2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Negativo 26 °C	0,57	fghij
m3i2t2	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Negativo 26 °C	0,57	fghij
m7i2t2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Negativo 26 °C	0,55	fghij
m3i1t2	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Positivo 26 °C	0,50	fghij
m3i1t1	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C	0,40	ghij
m5i2t3	Omar 2(5 veces menor BAP) Negativo 18 °C - 34 °C	0,33	ghij
m4i2t3	Omar 1(sin K. BAP) Negativo 18 °C - 34 °C	0,31	hij
m5i1t3	Omar 2(5 veces menor BAP) Positivo 18 °C - 34 °C	0,22	ij
m3i1t3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C - 34 °C	0,08	j
m2i2t1	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) Negativo 18 °C	0,04	j
m4i1t3	Omar 1(sin K. BAP) Positivo 18 °C - 34 °C	0,02	j
m1i1t3	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C - 34 °C	0,00	j
m1i2t3	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Negativo 18 °C - 34 °C	0,00	j
m2i1t3	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) Positivo 18 °C - 34 °C	0,00	j
m2i2t3	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) Negativo 18 °C - 34 °C	0,00	j
m3i2t1	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Negativo 18 °C	0,00	j
m3i2t3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Negativo 18 °C - 34 °C	0,00	j
m6i1t3	Omar 3 (testigo) Positivo 18 °C - 34 °C	0,00	j
m6i2t3	Omar 3 (testigo) Negativo 18 °C - 34 °C	0,00	j
m7i1t3	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Positivo 18 °C - 34 °C	0,00	j
m7i2t3	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Negativo 18 °C - 34 °C	0,00	j

ANEXO 10

AREA FOLIAR DEL PERIODO DE ENRAIZAMIENTO (TRATAMIENTOS A 18°C Y 26°C)

Obs.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Trat.	m1111	m1112	m1211	m1212	m2111	m2112	m2211	m2212	m3111	m3112	m3211	m3212	m4111	m4112	m4211
1	4,06	2,79	6,72	2,77	4,32	4,96	9,58	2,67	5,52	5,07	4,40	2,38	4,37	3,35	6,37
2	5,15	3,82	5,57	2,65	5,14	2,36	4,39	3,62	3,75	3,11	5,46	2,06	5,47	3,48	4,58
3	3,85	4,08	8,58	3,13	5,63	4,31	2,46	1,66	4,36	3,46	4,22	4,32	4,34	4,04	5,36
4	5,07	3,21	5,79	2,41	2,67	3,25	3,83	2,02	4,60	3,43	7,31	4,68	5,58	4,97	3,68
5	5,25	4,25	8,25	2,79	5,64	3,08	5,61	3,59	4,84	3,69	7,72	2,42	4,53	3,22	4,92
Σ Trat	23,37	18,14	34,91	13,75	23,40	17,96	25,87	13,56	23,07	18,76	29,10	15,86	24,30	19,05	24,91
x Trat	4,67	3,63	6,98	2,75	4,68	3,59	5,17	2,71	4,61	3,75	5,82	3,17	4,86	3,81	4,98

Obs.	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	Σ Total x Total
Trat.	m4212	m5111	m5112	m5211	m5212	m6111	m6112	m6211	m6212	m7111	m7112	m7211	m7212	
1	3,34	3,32	4,04	3,69	2,86	4,96	3,13	4,42	2,13	4,58	3,27	6,69	6,48	
2	3,14	3,63	2,47	5,46	2,95	4,64	2,69	6,03	3,14	4,93	4,11	6,18	12,54	
3	3,03	3,26	3,25	5,50	3,72	4,43	3,03	3,42	2,54	3,79	3,78	4,14	1,85	
4	2,39	4,55	3,10	6,66	2,35	1,59	3,60	5,86	2,85	5,46	3,27	3,93	1,29	
5	3,15	5,71	2,41	4,85	3,34	4,49	4,22	4,39	2,35	3,84	3,55	4,52	1,22	
Σ Trat	15,05	20,47	15,26	26,16	15,20	20,11	16,67	24,12	13,01	22,59	17,98	25,45	23,39	581,46
x Trat	3,01	4,09	3,05	5,23	3,04	4,02	3,33	4,82	2,60	4,52	3,60	5,09	4,68	4,15

ANEXO 11

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL ÁREA FOLIAR EN EL PERÍODO DE ENRAIZAMIENTO

F de V	GL	SC	CM	Fcal	
Total	139	363,24			
Tratamientos	27	148,56	5,5	2,87	**
Medio	6	11,47	1,91	1	ns
Inoculación	1	2,63	2,63	1,37	ns
M x I	6	6,18	1,03	0,54	ns
Temperatura	2	93,13	46,57	24,29	**
M x T	12	10,13	0,84	0,44	ns
I x T	2	15,93	7,96	4,16	*
M x I x T	12	9,09	0,76	0,4	ns
E. Exp.	112	214,6788	1,92		
Promedio =	4,15				
CV % =	33,33				

ANEXO 12

PRUEBA DE SIGNIFICACION DEL AREA FOLIAR EN EL PERIODO DE ENRAIZAMIENTO

Tukey al 5% para Temperaturas

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
t1	18 °C	4,97	a
t2	26 °C	3,34	b

Tukey al 5% para IxT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i2 t1	Negativo + 26 °C	5,44	a
i1 t1	Positivo + 18 °C	4,49	b
i1 t2	Positivo + 18 °C	3,54	c
i2 t2	Negativo + 26 °C	3,14	c

ANEXO 13

AREA FOLIAR DEL PERIODO DE ADAPTACION (TRATAMIENTOS A 18°C Y 26°C)

Obs	Trat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
		m11t1	m11t2	m12t1	m12t2	m21t1	m21t2	m22t1	m22t2	m31t1	m31t2	m32t1	m32t2	m41t1	m41t2	m42t1
1		12,21	12,32	9,52	14,74	17,51	9,52	13,76	11,22	16,86	15,52	2,58	16,93	20,24	20,22	13,04
2		14,14	10,28	9,87	11,16	13,52	1,54	10,94	15,50	14,25	15,22	2,55	18,03	19,98	16,63	9,93
3		13,73	16,40	8,10	9,04	18,97	26,31	7,47	10,37	15,10	15,69	3,13	12,51	16,27	16,76	9,86
4		21,22	15,23	7,90	14,82	9,25	5,75	10,43	11,89	16,72	14,89	2,18	11,02	18,98	14,06	8,64
5		16,94	18,66	14,17	23,38	13,92	10,41	10,09	19,00	17,03	18,80	2,63	16,15	19,41	13,52	12,11
	Σ Trat	78,24	72,90	49,56	73,15	73,18	53,53	52,68	67,98	79,96	80,11	13,05	74,65	94,89	81,18	53,59
	5	15,65	14,58	9,91	14,63	14,64	10,71	10,54	13,60	15,99	16,02	2,61	14,93	18,98	16,24	10,72

Obs	Trat	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	Σ Total	x
		m42t2	m51t1	m51t2	m52t1	m52t2	m61t1	m61t2	m62t1	m62t2	m71t1	m71t2	m72t1	m72t2	Σ Total	x
1		15,19	16,08	15,29	9,34	15,31	20,19	19,94	8,50	11,04	15,21	20,73	18,25	8,73		
2		16,59	14,71	14,16	11,45	17,91	17,07	16,29	8,21	18,26	15,35	17,50	9,93	13,79		
3		20,37	16,50	18,74	11,75	17,87	16,80	19,82	8,50	19,31	16,06	18,64	9,86	11,66		
4		11,77	18,27	15,35	12,88	15,20	6,33	18,29	9,15	16,32	14,69	17,04	11,25	7,12		
5		21,38	14,55	14,70	9,73	21,85	15,98	21,87	8,54	14,85	15,25	18,18	7,02	11,87		
	Σ Trat	85,30	80,11	78,24	55,14	88,14	76,38	96,21	42,92	79,79	76,55	92,08	56,32	53,17	1958,99	
	x Trat	17,06	16,02	15,65	11,03	17,63	15,28	19,24	8,58	15,96	15,31	18,42	11,26	10,63		13,99

ANEXO 14

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL ÁREA FOLIAR EN EL PERÍODO DE ADAPTACIÓN

F de V	GL	SC	CM	Fcal	
Total	139	3043,81			
Tratamientos	27	1816,46	67,28	6,14	**
Medio	6	203,47	33,91	3,09	**
Inoculación	1	513,59	513,59	46,87	**
M x I	6	170,42	28,4	2,59	*
Temperatura	2	268,5	134,25	12,25	**
M x T	12	172,85	14,4	1,31	ns
I x T	2	297,2	148,6	13,56	**
M x I x T	12	190,44	15,87	1,45	ns
E. Exp.	112	1227,343	10,96		
Promedio =	13,99				
CV % =	23,66				

ANEXO 15

PRUEBA DE SIGNIFICACION DEL AREA FOLIAR EN EL PERIODO DE ADAPTACION

94

Tukey al 5% para Medios de Cultivo

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4	Omar 1(sin K. BAP)	15,75	a
m5	Omar 2(5 veces menor BAP)	15,08	ab
m6	Omar 3 (testigo)	14,76	ab
m7	Omar 4(5 veces mayor.BAP)	13,91	ab
m1	PEG 1 (3% Polygthylene Glycol)	13,69	ab
m3	PEG 3 (9% Polygthylene Glicol)	12,39	b
m2	PEG 2 (6%Polygthylene Glycol)	12,37	b

DMS al 5% para Inoculación

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i1	Positivo	15,91	a
i2	Negativo	12,08	b

Tukey al 5% para Mxi

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4 i2	Omar 1(sin K. BAP) + Negativo	17,61	a
m6 i2	Omar 3 (testigo) + Negativo	17,26	ab
m7 i1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + Positivo	16,86	abc
3 i1	PEG 3 (9% Polygthylene Glicol) + Positivo	16,01	abcd
5 i1	Omar 2(5 veces menor BAP) + Positivo	15,84	abcd
1 i1	PEG 1 (3% Polygthylene Glycol) + Positivo	15,11	abcd
5 i2	Omar 2(5 veces menor BAP) + Negativo	14,33	abcd
4 i1	Omar 1(sin K. BAP) + Positivo	13,89	abcd
2 i2	PEG 2 (6%Polygthylene Glycol) + Negativo	12,67	abcde
6 i1	Omar 3 (testigo) + Positivo	12,27	bcde
1 i2	PEG 1 (3% Polygthylene Glycol) + Negativo	12,27	bcde
2 i1	PEG 2 (6%Polygthylene Glycol) + Positivo	12,07	cde
7 i2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + Negativo	10,95	de
3 i2	PEG 3 (9% Polygthylene Glicol) + Negativo	8,77	e

DMS al 5% para Temperaturas

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
t2	26 °C	15,38	a
t1	18 °C	12,61	b

Tukey al 5% para IxT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
t1	Positivo + 18 °C	15,98	a
t2	Positivo + 26 °C	15,84	a
t2	Negativo + 26 °C	14,92	a
t1	Negativo + 18 °C	9,24	b

ANEXO 16

ALTURA EN EL PERIODO DE ESTRÉS (BLOQUE 18°C, 26°C Y 18°C-34°C)

Obs.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Trat	m11t1	m11t2	m11t3	m12t1	m12t2	m12t3	m21t1	m21t2	m21t3	m22t1	m22t2	m22t3	m31t1	m31t2	m31t3	m32t1	m32t2	m32t3	m41t1	m41t2	m41t3
1	2,20	1,28	0,55	1,93	1,53	0,33	1,48	1,55	0,60	1,45	1,48	0,73	1,28	1,18	0,50	0,55	0,68	0,50	2,15	2,23	0,63
2	1,08	1,08	0,55	1,80	1,63	0,55	1,58	1,40	0,53	1,48	1,60	0,45	1,10	0,90	0,53	0,45	0,63	0,48	2,38	1,98	0,55
3	1,73	1,13	0,55	1,48	1,63	0,30	1,10	1,33	0,55	1,73	1,03	0,58	0,95	0,83	0,65	0,63	0,70	0,68	1,60	1,73	0,55
4	2,05	1,00	0,50	1,33	1,65	0,33	1,10	1,05	0,58	1,58	1,00	0,53	0,80	0,78	0,80	0,60	0,75	0,38	2,23	2,10	0,50
5	1,58	1,05	0,60	1,63	1,48	0,38	0,98	0,80	0,50	1,43	1,05	0,70	0,78	0,98	0,65	0,43	1,18	0,63	2,25	1,83	0,80
Σ Trat	8,63	5,53	2,75	8,15	7,90	1,88	6,23	6,13	2,75	7,65	6,15	2,98	4,90	4,65	3,13	2,65	3,93	2,65	10,60	9,85	3,03
x Trat	1,73	1,11	0,55	1,63	1,58	0,38	1,25	1,23	0,55	1,53	1,23	0,60	0,98	0,93	0,63	0,53	0,79	0,53	2,12	1,97	0,61

	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	Σ Total x Total
	m42t1	m42t2	m42t3	m51t1	m51t2	m51t3	m52t1	m52t2	m52t3	m61t1	m61t2	m61t3	m62t1	m62t2	m62t3	m71t1	m71t2	m71t3	m72t1	m72t2	m72t3	
	1,28	2,50	0,55	1,45	2,13	0,68	1,73	1,05	0,58	2,13	1,88	0,60	1,78	1,48	0,38	1,30	1,15	0,50	1,05	1,20	0,40	
	2,13	2,00	0,93	1,53	1,80	0,65	1,55	1,15	0,58	1,70	1,60	0,58	1,23	1,10	0,48	1,63	1,45	0,60	0,70	1,25	0,70	
	1,95	1,78	0,68	2,03	1,68	0,55	1,90	2,15	0,60	1,83	1,90	0,63	0,73	0,40	0,53	0,93	1,90	0,58	0,95	1,05	0,25	
	1,93	1,38	0,53	1,55	1,80	0,45	1,30	1,70	0,88	1,98	1,80	0,55	1,05	2,30	0,40	0,78	1,63	0,55	0,65	0,50	0,50	
	1,90	0,78	0,98	2,00	1,67	0,75	1,65	2,05	0,88	2,05	1,48	0,48	1,25	1,53	0,63	1,83	2,05	0,43	1,30	0,50	0,55	
	9,18	8,43	3,65	8,55	9,07	3,08	8,13	8,10	3,50	9,68	8,65	2,83	6,03	6,80	2,40	6,45	8,18	2,65	4,65	4,50	2,40	238,95
	1,84	1,69	0,73	1,71	1,81	0,62	1,63	1,62	0,70	1,94	1,73	0,57	1,21	1,36	0,48	1,29	1,64	0,53	0,93	0,90	0,48	1,14

ANEXO 17

ANÁLISIS DE VARIANZA DE ALTURA EN EL PERÍODO DE ESTRÉS

F de V	GL	SC	CM	Fcal	
Total	209	69,17			
Tratamientos	41	56,56	1,38	18,39	**
Medio	6	11,34	1,89	25,19	**
Inoculación	1	1,16	1,16	15,44	**
M x I	6	1,83	0,3	4,06	*
Temperatura	2	34,38	17,19	229,11	**
M x T	12	5,45	0,45	6,05	**
I x T	2	0,46	0,23	3,09	*
M x I x T	12	1,95	0,16	2,17	*
E. Exp.	168	12,603	0,08		
Promedio =	1,14				
CV % =	24,07				

ANEXO 18

PRUEBA DE SIGNIFICACION DE ALTURA EN EL PERIODO DE ESTRES Tukey al 5% para Medios de Cultivo

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4	Omar 1(sin K. BAP)	1,49	a
m5	Omar 2(5 veces menor BAP)	1,35	ab
m6	Omar 3 (testigo)	1,21	bc
m1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	1,16	bcd
m2	PEG 2 (6%Polietilen Glicol)	1,06	cd
m7	Omar 4(5 veces mayor.BAP)	0,96	d
m3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol)	0,73	e

DMS al 5% para Inoculación

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i1	Positivo	1,21	a
i2	Negativo	1,06	b

Tukey al 5% para Mxl

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4 i2	Omar 1(sin K. BAP) + Negativo	1,57	a
m4 i1	Omar 1(sin K. BAP) + Positivo	1,42	ab
m6 i2	Omar 3 (testigo) + Negativo	1,41	ab
m5 i1	Omar 2(5 veces menor BAP) + Positivo	1,38	ab
m5 i2	Omar 2(5 veces menor BAP) + Negativo	1,32	abc
m1 i2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + Negativo	1,20	bd
m7 i1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + Positivo	1,15	bcd
m1 i1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + Positivo	1,13	bcd
m2 i1	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) + Positivo	1,12	bcd
m6 i1	Omar 3 (testigo) + Positivo	1,02	cde
m2 i2	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) + Negativo	1,01	cde
m3 i1	PEG 3 (9%Polietilen Glicol) + Positivo	0,85	def
m7 i2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + Negativo	0,77	ef
m3 i2	PEG 3 (9%Polietilen Glicol) + Negativo	0,62	f

Tukey al 5% para Temperaturas

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
t1	18 °C	1,45	a
t2	26 °C	1,40	a
t3	18 °C - 34 °C	0,57	b

ANEXO 19

Tukey al 5% para MxT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4 t1	Omar 1(sin K. BAP) + 18 °C	1,98	a
m4 t2	Omar 1(sin K. BAP) + 26 °C	1,83	ab
m5 t3	Omar 2(5 veces menor BAP) + 18 °C - 34	1,72	abc
m1 t1	PEG 1 (3%Polietilen Glicol) + 18 °C	1,68	abcd
m5 t2	Omar 2(5 veces menor BAP) + 26 °C	1,67	abcde
m6 t3	Omar 3 (testigo) + 18 °C - 34	1,57	abcde
m6 t1	Omar 3 (testigo) + 18 °C	1,55	abcdef
m2 t2	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) + 26 °C	1,39	bcdef
m1 t2	PEG 1 (3%Polietilen Glicol) + 26 °C	1,34	cdef
m7 t2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + 26 °C	1,27	defg
m2 t3	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) + 18 °C - 34	1,23	efg
m7 t1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + 18 °C	1,11	fgh
m3 t1	PEG 3 (9%Polietilen Glicol) + 18 °C	0,86	ghi
m3 t3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) + 18 °C - 34	0,76	hi
m4 t3	Omar 1(sin K. BAP) + 18 °C - 34	0,67	hi
m5 t1	Omar 2(5 veces menor BAP) + 18 °C	0,66	i
m3 t2	PEG 3 (9%Polietilen Glicol) + 26 °C	0,58	i
m2 t1	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) + 18 °C	0,57	i
m6 t2	Omar 3 (testigo) + 26 °C	0,52	i
m7 t3	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + 18 °C - 34	0,51	i
m1 t3	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + 18 °C - 34	0,46	i

Tukey al 5% para lxT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i1 t1	Positivo + 18 °C	1,57	a
i1 t2	Positivo + 26 °C	1,49	ab
i2 t1	Negativo + 18 °C	1,33	b
i2 t2	Negativo + 26 °C	1,31	b
i1 t3	Positivo + 18 °C - 34 °C	0,58	c
i2 t3	Negativo + 18 °C - 34 °C	0,56	c

ANEXO 20

Tukey al 5% para MxlXT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4i1t1	Omar 1(sin K. BAP) Positivo 18 °C	2,12	a
m4i1t2	Omar 1(sin K. BAP) Positivo 26 °C	1,97	ab
m6i1t1	Omar 3 (testigo) Positivo 18 °C	1,94	ab
m4i2t1	Omar 1(sin K. BAP) Negativo 18 °C	1,84	abc
m5i1t2	Omar 2(5 veces menor BAP) Positivo 26 °C	1,81	abcd
m6i1t2	Omar 3 (testigo) Positivo 26 °C	1,73	abcd
m1i1t1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C	1,73	abcd
m5i1t1	Omar 2(5 veces menor BAP) Positivo 18 °C	1,71	abcde
m4i2t2	Omar 1(sin K. BAP) Negativo 26 °C	1,69	abcde
m7i1t2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Positivo 26 °C	1,64	abcde
m1i2t1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Negativo 18 °C	1,63	abcde
m5i2t1	Omar 2(5 veces menor BAP) Negativo 18 °C	1,63	abcde
m5i2t2	Omar 2(5 veces menor BAP) Negativo 26 °C	1,62	abcde
m1i2t2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Negativo 26 °C	1,58	abcdef
m2i2t1	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) Negativo 18 °C	1,53	abcdefg
m6i2t2	Omar 3 (testigo) Negativo 26 °C	1,36	bcdefgh
m7i1t1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Positivo 18 °C	1,29	cdefghi
m2i1t1	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C	1,25	cdefghi
m2i2t2	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) Negativo 26 °C	1,23	cdefghij
m2i1t2	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) Positivo 26 °C	1,23	cdefghij
m6i2t1	Omar 3 (testigo) Negativo 18 °C	1,21	defghijk
m1i1t2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Positivo 26 °C	1,11	efghijkl
m3i1t1	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C	0,98	fghijklm
m3i1t2	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Positivo 26 °C	0,93	ghijklm
m7i2t1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Negativo 18 °C	0,93	ghijklm
m7i2t2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Negativo 26 °C	0,90	hijklm
m3i2t2	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Negativo 26 °C	0,79	hijklm
m4i2t3	Omar 1(sin K. BAP) Negativo 18 °C - 34	0,73	ijklm
m5i2t3	Omar 2(5 veces menor BAP) Negativo 18 °C - 34	0,70	ijklm
m3i1t3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C - 34	0,63	jklm
m5i1t3	Omar 2(5 veces menor BAP) Positivo 18 °C - 34	0,62	jklm
m4i1t3	Omar 1(sin K. BAP) Positivo 18 °C - 34	0,61	klm
m2i2t3	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) Negativo 18 °C - 34	0,60	klm
m6i1t3	Omar 3 (testigo) Positivo 18 °C - 34	0,57	lm
m1i1t3	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C - 34	0,55	lm
m2i1t3	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) Positivo 18 °C - 34	0,55	lm
m3i2t1	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Negativo 18 °C	0,53	lm
m3i2t3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) Negativo 18 °C - 34	0,53	lm
m7i1t3	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Positivo 18 °C - 34	0,53	m
m6i2t3	Omar 3 (testigo) Negativo 18 °C - 34	0,48	m
m7i2t3	Omar 4(5 veces mayor.BAP) Negativo 18 °C - 34	0,48	m
m1i2t3	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) Negativo 18 °C - 34	0,38	m

ANEXO 21

ALTURA EN EL PERIODO DE ENRAIZAMIENTO A 18°C Y 26°C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Obs	m11t1	m11t2	m12t1	m12t2	m21t1	m21t2	m22t1	m22t2	m31t1	m31t2	m32t1	m32t2	m41t1	m41t2	m42t1	m42t2	m51t1	m51t2
1	2,45	1,38	1,75	1,43	2,70	1,60	2,00	1,38	2,67	1,45	1,95	1,03	2,53	1,75	2,57	1,65	1,88	1,70
2	1,93	1,63	2,10	1,45	2,08	1,80	2,70	1,50	2,43	1,50	1,93	1,50	2,35	1,68	1,80	1,53	1,83	1,48
3	2,43	1,78	1,60	1,50	2,13	1,65	1,35	1,28	2,23	1,65	2,40	0,85	1,80	1,45	2,18	1,48	1,63	1,55
4	4,00	1,10	2,10	1,47	1,30	1,40	1,80	1,33	2,47	1,40	2,27	1,50	2,27	1,93	2,03	1,53	1,90	1,70
5	2,98	1,40	2,35	1,40	1,85	6,50	1,95	1,60	2,43	1,75	2,00	1,20	2,13	1,58	2,30	1,73	2,33	1,58
Σ Trat	13,79	7,28	9,90	7,24	10,05	12,95	9,80	7,08	12,22	7,75	10,54	6,08	11,07	8,38	10,87	7,90	9,56	8,00
x Trat	2,76	1,46	1,98	1,45	2,01	2,59	1,96	1,42	2,44	1,55	2,11	1,22	2,21	1,68	2,17	1,58	1,91	1,60

19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	Σ Total x Total
m52t1	m52t2	m61t1	m61t2	m62t1	m62t2	m71t1	m71t2	m72t1	m72t2	
1,83	1,80	1,90	1,73	2,08	1,18	1,85	1,65	3,13	2,05	
2,30	1,63	2,05	1,63	2,10	1,30	1,88	1,75	2,00	2,50	
2,35	2,05	1,78	1,50	1,90	1,60	1,60	1,55	2,28	0,98	
2,90	1,60	0,53	2,08	1,88	1,85	2,00	1,50	1,63	1,00	
2,00	1,55	1,55	2,03	1,50	1,48	1,55	1,33	1,45	1,15	
11,38	8,63	7,80	8,96	9,45	7,40	8,88	7,78	10,48	7,68	258,87
2,28	1,73	1,56	1,79	1,89	1,48	1,78	1,56	2,10	1,54	1,85

ANEXO 22

ANÁLISIS DE VARIANZA DE ALTURA EN EL PERÍODO DE ENRAIZAMIENTO

F de V	GL	SC	CM	Fcal	
Total	139	52,76			
Tratamientos	27	19,61	0,73	2,45	Ns
Medio	6	1,4	0,23	0,79	Ns
Inoculación	1	0,72	0,72	2,43	Ns
M x I	6	2,92	0,49	1,64	Ns
Temperatura	2	7,62	3,81	12,87	**
M x T	12	3,89	0,32	1,1	Ns
I x T	2	0,47	0,24	0,8	Ns
M x I x T	12	2,58	0,21	0,73	Ns
E. Exp.	112	33,15544	0,3		
Promedio =	1,85				
CV % =	29,43				

ANEXO 23

ALTURA PERIODO DE ADAPTACION

Obs.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Trat.	m11t11	m11t12	m12t11	m12t12	m21t11	m21t12	m22t11	m22t12	m31t11	m31t12	m32t11	m32t12	m41t11	m41t12	m42t11	m42t12	m51t11	m51t12
1	2,69	2,49	2,28	2,73	3,30	2,16	3,34	2,34	3,18	2,63	2,38	2,78	3,23	3,46	3,11	2,74	2,71	3,49
2	2,71	2,16	2,31	2,33	3,44	1,71	2,59	2,58	3,15	2,70	2,38	2,75	3,33	3,01	2,71	3,03	2,61	3,38
3	2,90	2,79	2,35	2,71	3,00	3,33	2,36	2,09	2,76	2,91	2,88	1,90	2,04	3,12	2,91	3,12	3,04	3,81
4	2,10	2,30	2,63	2,58	2,09	2,55	2,30	2,24	3,19	2,43	2,68	1,70	3,16	3,46	3,09	2,64	3,21	3,02
5	2,00	3,28	2,48	3,23	2,84	2,34	2,25	3,29	3,63	3,04	2,33	2,29	3,20	3,30	3,41	3,89	3,61	3,00
Σ Trat	12,40	13,02	12,05	13,59	14,67	12,09	12,84	12,54	15,90	13,71	12,65	11,43	14,95	16,35	15,23	15,41	15,18	16,69
x Trat	2,48	2,60	2,41	2,72	2,93	2,42	2,57	2,51	3,18	2,74	2,53	2,29	2,99	3,27	3,05	3,08	3,04	3,34

19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	Σ Total x Total
m52t11	m52t12	m61t11	m61t12	m62t11	m62t12	m71t11	m71t12	m72t11	m72t12	
2,36	3,09	3,16	3,69	2,54	2,13	2,78	3,16	3,81	2,26	
2,91	3,31	2,98	3,10	2,83	2,76	2,93	2,98	2,59	2,60	
3,04	3,58	3,18	3,59	2,77	3,68	2,89	3,29	2,82	2,54	
3,60	3,13	1,38	3,39	2,58	3,33	2,98	3,10	2,81	1,98	
2,60	3,34	2,69	3,48	2,07	2,93	2,91	3,46	2,40	2,68	
14,51	16,45	13,39	17,26	12,79	14,83	14,48	15,98	14,43	12,06	401,00
2,90	3,29	2,68	3,45	2,56	2,97	2,90	3,20	2,89	2,41	2,86

ANEXO 24

ANÁLISIS DE VARIANZA DE ALTURA EN EL PERÍODO DE ADAPTACIÓN

F de V	GL	SC	CM	Fcal	
Total	139	35,33			
Tratamientos	27	14,86	0,55	3,01	**
Medio	6	4,86	0,81	4,43	**
Inoculación	1	2,69	2,69	14,74	**
M x I	6	1,02	0,17	0,93	ns
Temperatura	2	0,02	0,01	0,06	ns
M x T	12	3,68	0,31	1,68	ns
I x T	2	0,02	0,01	0,06	ns
M x I x T	12	2,56	0,21	1,17	ns
E. Exp.	112	20,467	0,18		
Promedio =	2,86				
CV % =	14,92				

ANEXO 25

PRUEBA DE SIGNIFICACION DE ALTURA EN EL PERIODO DE ADAPTACION

Tukey al 5% para Medios de Cultivo

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m5	Omar 2 (5 veces < de la dosis normal de	3,14	a
m4	Omar 1(sin K. BAP)	3,10	a
m6	Omar 3 (testigo)	2,91	ab
m7	Omar 4(5 veces mayor.BAP)	2,85	ab
m1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	2,76	ab
m3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol)	2,68	b
m2	PEG 2 (6%Polietilen Glicol)	2,61	b

DMS al 5% para Inoculación

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i1	Positivo	3,00	a
i2	Negativo	2,73	b

ANEXO 26

PESO EN EL PERIODO DE ESTRÉS (TRATAMIENTOS A 18°C, 26°C Y 18°C - 34°C)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Obs	m11t1	m11t2	m11t3	m12t1	m12t2	m12t3	m21t1	m21t2	m21t3	m22t1	m22t2	m22t3	m31t1	m31t2	m31t3	m32t1	m32t2	m32t3	m41t1	m41t2	m41t3	
Trat																						
1	0,36	0,20	0,08	0,35	0,34	0,08	0,47	0,32	0,07	0,46	0,21	0,11	0,23	0,18	0,13	0,23	0,19	0,12	0,49	0,57	0,18	
2	0,27	0,18	0,10	0,66	0,25	0,12	0,24	0,30	0,06	0,43	0,35	0,08	0,15	0,22	0,09	0,10	0,17	0,11	0,49	0,46	0,13	
3	0,32	0,14	0,08	0,43	0,28	0,07	0,21	0,21	0,12	0,44	0,20	0,10	0,11	0,11	0,09	0,21	0,11	0,10	0,36	0,38	0,09	
4	0,44	0,16	0,10	0,45	0,32	0,09	0,23	0,15	0,06	0,27	0,15	0,13	0,11	0,11	0,11	0,24	0,15	0,07	0,52	0,42	0,12	
5	0,23	0,17	0,08	0,73	0,26	0,06	0,25	0,11	0,10	0,34	0,16	0,20	0,09	0,17	0,11	0,14	0,15	0,17	0,49	0,28	0,21	
Σ Trat	1,61	0,85	0,44	2,61	1,44	0,42	1,38	1,09	0,40	1,94	1,07	0,61	0,69	0,78	0,53	0,91	0,76	0,56	2,35	2,10	0,72	
x Trat	0,32	0,17	0,09	0,52	0,29	0,08	0,28	0,22	0,08	0,39	0,21	0,12	0,14	0,16	0,11	0,18	0,15	0,11	0,47	0,42	0,14	

	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	Σ Total x Total
Obs	m42t1	m42t2	m42t3	m51t1	m51t2	m51t3	m52t1	m52t2	m52t3	m61t1	m61t2	m61t3	m62t1	m62t2	m62t3	m71t1	m71t2	m71t3	m72t1	m72t2	m72t3	
Trat																						
1	0,41	0,62	0,19	0,32	0,52	0,14	0,40	0,27	0,12	0,48	0,45	0,16	0,56	0,40	0,12	0,38	0,35	0,15	0,41	0,29	0,15	
2	0,59	0,37	0,24	0,40	0,41	0,10	0,45	0,33	0,10	0,27	0,46	0,15	0,45	0,24	0,14	0,43	0,42	0,11	0,35	0,26	0,12	
3	0,60	0,38	0,18	0,42	0,39	0,12	0,55	0,54	0,14	0,42	0,51	0,17	0,51	0,18	0,30	0,39	0,59	0,17	0,32	0,23	0,04	
4	0,82	0,38	0,10	0,28	0,29	0,12	0,30	0,35	0,13	0,51	0,51	0,13	0,68	0,46	0,20	0,63	0,41	0,13	0,41	0,19	0,11	
5	0,65	0,28	0,17	0,48	0,40	0,15	0,59	0,60	0,12	0,40	0,34	0,12	0,58	0,35	0,24	0,28	0,37	0,09	0,57	0,18	0,14	
Σ Trat	3,05	2,03	0,89	1,90	2,01	0,62	2,29	2,09	0,60	2,08	2,26	0,73	2,77	1,63	0,99	2,01	2,14	0,64	2,04	1,14	0,56	57,7
x Trat	0,61	0,41	0,18	0,38	0,40	0,12	0,46	0,42	0,12	0,42	0,45	0,15	0,55	0,33	0,20	0,40	0,43	0,13	0,41	0,23	0,11	0,27

ANEXO 27

ANALISIS DE VARIANZA DEL PESO EN EL PERIODO DE ESTRÉS

F de V	GL	SC	CM	Fcal
Total	209	5,75		
Tratamientos	41	4,71	0,11	18,67 **
Medio	6	1,16	0,19	31,46 **
Inoculación	1	0,04	0,04	7,28 **
M x I	6	0,12	0,02	3,38 ns
Temperatura	2	2,66	1,33	215,60 **
M x T	12	0,46	0,04	6,18 **
I x T	2	0,16	0,08	13,08 **
M x I x T	12	0,11	0,01	1,47 ns
E. Exp.	168	1,034850622	0,01	
Promedio = 0,27				
CV % = 28,57				

ANEXO 28

107

PRUEBA DE SIGNIFICACION DE PESO EN EL PERIODO DE ESTRÉS Tukey al 5% para Medios de Cultivo

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4	Omar 1(sin K. BAP)	0,37	a
m6	Omar 2(5 veces menor BAP)	0,35	a
m5	Omar 3 (testigo)	0,32	ab
m7	Omar 4(5 veces mayor.BAP)	0,28	bc
m1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	0,25	c
m2	PEG 2 (6%Polietilen Glicol)	0,22	c
m3	PEG 3 (9%Polietilen Glicol)	0,14	d

DMS al 5% para Inoculación

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i2	Negativo	0,29	a
i1	Positivo	0,26	b

Tukey al 5% para Temperaturas

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
t1	18 °C	0,39	a
t2	26 °C	0,31	b
t3	18 °C - 34 °C	0,12	c

Tukey al 5% para MxT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4 t1	Omar 1(sin K. BAP) + 18 °C	0,54	a
m6 t3	Omar 3 (testigo) + 18 °C - 34	0,48	ab
m1 t1	PEG 1 (3%Polietilen Glicol) + 18 °C	0,42	abc
m5 t2	Omar 2(5 veces menor BAP) + 26 °C	0,42	abc
m4 t2	Omar 1(sin K. BAP) + 26 °C	0,41	abc
m5 t3	Omar 2(5 veces menor BAP) + 18 °C - 34	0,41	abc
m7 t1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + 18 °C	0,41	abc
m6 t1	Omar 3 (testigo) + 18 °C	0,39	bc
m2 t2	PEG 2 (6%Polietilen Glicol) + 26 °C	0,33	bcd
m7 t2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + 26 °C	0,33	cd
m1 t2	PEG 1 (3%Polietilen Glicol) + 26 °C	0,23	de
m2 t3	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) + 18 °C - 34	0,22	def
m6 t2	Omar 3 (testigo) + 26 °C	0,17	ef
m3 t3	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) + 18 °C - 34	0,16	ef
m4 t3	Omar 1(sin K. BAP) + 18 °C - 34	0,16	ef
m3 t1	PEG 3 (9%Polietilen Glicol) + 18 °C	0,15	ef
m5 t1	Omar 2(5 veces menor BAP) + 18 °C	0,12	ef
m7 t3	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + 18 °C - 34	0,12	ef
m3 t2	PEG 3 (9%Polietilen Glicol) + 26 °C	0,11	ef
m2 t1	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) + 18 °C	0,10	ef
m1 t3	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + 18 °C - 34	0,09	f

ANEXO 29

Tukey al 5% para IxT

Codigo	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i2 t1	Negativo + 18 °C	0,45	a
i1 t1	Positivo + 18 °C	0,34	b
i1 t2	Positivo + 26 °C	0,32	b
i2 t2	Negativo + 26 °C	0,29	b
i2 t3	Negativo + 18 °C - 34 °C	0,13	c
i1 t3	Positivo + 18 °C - 34 °C	0,12	c

ANEXO 30

PESO EN EL PERIODO DE ENRAIZAMIENTO

Obs.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Trat.	m1111	m1112	m1211	m1212	m2111	m2112	m2211	m2212	m3111	m3112	m3211	m3212	m4111	m4112
1	1,51	1,31	1,85	1,56	0,98	0,54	1,48	1,10	1,74	1,08	1,24	1,05	1,68	1,63
2	0,97	0,68	1,84	1,45	1,58	1,07	2,05	1,20	1,19	0,46	1,08	0,73	1,97	1,84
3	1,09	1,03	1,59	0,94	1,17	1,04	0,90	1,06	1,30	1,15	1,39	0,78	1,42	1,10
4	0,87	1,59	1,25	1,02	1,03	1,00	1,57	1,10	1,57	0,65	1,62	0,82	1,88	1,03
5	1,67	1,56	1,51	1,22	1,72	0,56	1,48	0,61	1,38	1,47	1,47	0,74	1,81	1,03
Σ Trat	6,11	6,16	8,04	6,18	6,47	4,20	7,47	5,07	7,18	4,80	6,79	4,11	8,76	6,63
x Trat	1,22	1,23	1,61	1,24	1,29	0,84	1,49	1,01	1,44	0,96	1,36	0,82	1,75	1,33

Obs.	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Trat.	m4211	m4212	m5111	m5112	m5211	m5212	m6111	m6112	m6211	m6212	m7111	m7112	m7211	m7212
1	2,03	1,89	1,51	1,59	1,67	1,04	1,66	1,45	1,82	0,98	1,57	1,36	1,86	0,71
2	1,41	1,44	1,28	1,30	2,11	1,23	1,40	1,46	1,84	0,98	1,44	1,63	1,36	0,81
3	1,69	1,04	1,40	1,25	2,50	1,67	1,39	1,48	1,45	1,10	1,04	1,88	1,25	0,48
4	2,22	1,33	1,48	1,33	1,70	0,96	0,94	1,56	1,50	1,33	1,32	1,41	1,28	0,48
5	2,00	1,44	1,54	1,35	1,72	1,44	1,69	1,68	1,53	1,16	1,37	1,65	1,37	0,80
Σ Trat	9,35	7,14	7,20	6,81	9,70	6,33	7,08	7,62	8,13	5,55	6,73	7,91	7,12	3,27
x Trat	1,87	1,43	1,44	1,36	1,94	1,27	1,42	1,52	1,63	1,11	1,35	1,58	1,42	0,65
Σ Total x Total														187,88
														1,34

ANEXO 31

ANALISIS DE VARIANZA DEL PESO EN EL PERIODO DE ENRAIZAMIENTO

F de V	GL	SC	CM	Fcal
Total	139	20,42		
Tratamientos	27	12,29	0,46	6,27 **
Medio	6	3,52	0,59	8,07 **
Inoculación	1	0,00	0,00	0,03 ns
M x I	6	1,64	0,27	3,77 **
Temperatura	2	4,23	2,12	29,15 **
M x T	12	0,51	0,04	0,59 ns
I x T	2	1,31	0,65	9,01 **
M x I x T	12	1,07	0,09	1,23 ns
E. Exp.	112	8,13	0,07	
Promedio = 1,34				
CV % = 20,08				

ANEXO 32

PRUEBA DE SIGNIFICACION DE PESO EN EL PERIODO DE ENRAIZAMIENTO

Tukey al 5% para Medios de Cultivo

Código	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4	Omar 1(sin K. BAP)	1,59	a
m5	Omar 2(5 veces menor BAP)	1,50	ab
m6	Omar 3 (testigo)	1,42	abc
m1	PEG 1 (3% Polietilen Glicol)	1,32	bcd
m7	Omar 4(5 veces mayor.BAP)	1,25	bcd
m2	PEG 2 (6% Polietilen Glicol)	1,16	cd
m3	PEG 3 (9%Polietilen Glicol)	1,14	d

Tukey al 5% para MxI

Código	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
m4 i1	Omar 1(sin K. BAP) + Positivo	1,65	a
m5 i2	Omar 2(5 veces menor BAP) + Negativo	1,60	ab
m4 i2	Omar 1(sin K. BAP) + Negativo	1,54	ab
m6 i2	Omar 3 (testigo) + Negativo	1,47	abc
m7 i1	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + Positivo	1,46	abc
m1 i2	PEG 1 (3% Polietilen Glicol) + Negativo	1,42	abcd
m5 i1	Omar 2(5 veces menor BAP) + Positivo	1,40	abcd
m6 i1	Omar 3 (testigo) + Positivo	1,37	abcd
m2 i1	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) + Positivo	1,25	abcd
m1 i1	PEG 1 (3%Polietilen Glicol) + Positivo	1,23	bcd
m3 i1	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) + Positivo	1,20	bcd
m3 i2	PEG 3 (9% Polietilen Glicol) + Negativo	1,09	cd
m2 i2	PEG 2 (6% Polietilen Glicol) + Negativo	1,07	cd
m7 i2	Omar 4(5 veces mayor.BAP) + Negativo	1,04	d

DMS al 5% para Temperaturas

Código	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
t1	18 °C	1,52	a
t2	26 °C	1,17	b

Tukey al 5% para IxT

Código	Tratamientos	Promedios	R. Signif.
i2 t1	Negativo + 18 °C	1,61661905	a
i1 t1	Positivo + 18 °C	1,41511905	b
i1 t2	Positivo + 26 °C	1,26071429	b
i2 t2	Negativo + 26 °C	1,0755	c

ANEXO 33

Crecimiento Radicular, Período de Stress

tratamiento	Datos Observados																			Porcentajes					
	X	2X	3X	4X	X	2X	3X	4X	X	2X	3X	4X	X	2X	3X	4X	X	2X	3X	4X	X	2X	3X	4X	
1	m1i1t1	2X	2X	X	X	X	X	2X	2X	X	3X	3X	X	X	2X	2X	2X	2X	3X	2X	2X	35	50	15	0
2	m1i1t2	X	X	X	2X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2X	X	X	X	2X	85	15	0	0
3	m1i1t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
4	m1i2t1	3X	2X	X	2X	X	X	2X	X	2X	2X	2X	2X	X	25	70	5	0							
5	m1i2t2	X	X	X	3X	2X	X	3X	3X	X	X	X	3X	X	X	2X	X	X	2X	X	X	65	15	20	0
6	m1i2t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
7	m2i1t1	2X	X	X	2X	X	2X	X	X	X	2X	2X	X	2X	X	2X	X	2X	X	X	X	65	35	0	0
8	m2i1t2	2X	X	X	X	2X	2X	2X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	80	20	0	0
9	m2i1t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
10	m2i2t1	X	2X	2X	2X	X	X	X	X	2X	2X	2X	2X	X	X	X	2X	2X	X	2X	45	55	0	0	
11	m2i2t2	X	2X	X	X	X	2X	3X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	85	10	5	0
12	m2i2t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
13	m3i1t1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
14	m3i1t2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2X	X	X	X	X	95	5	0	0
15	m3i1t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
16	m3i2t1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
17	m3i2t2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
18	m3i2t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
19	m4i1t1	2X	3X	4X	4X	3X	4X	3X	4X	X	3X	4X	3X	2X	4X	3X	4X	3X	3X	3X	3X	5	10	50	35
20	m4i1t2	3X	3X	3X	4X	3X	4X	X	3X	3X	X	3X	3X	3X	X	3X	2X	2X	2X	2X	2X	15	25	50	10
21	m4i1t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
22	m4i2t1	3X	4X	4X	4X	3X	3X	3X	3X	3X	2X	3X	2X	2X	3X	2X	3X	2X	2X	3X	3X	0	30	55	15
23	m4i2t2	3X	3X	3X	4X	3X	3X	4X	X	2X	2X	3X	2X	2X	2X	3X	3X	2X	2X	2X	5	45	40	10	
24	m4i2t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
25	m5i1t1	3X	2X	3X	3X	X	2X	3X	3X	2X	2X	4X	2X	X	2X	3X	2X	2X	3X	3X	2X	10	45	40	5
26	m5i1t2	2X	2X	3X	3X	2X	3X	3X	3X	2X	2X	2X	3X	3X	2X	3X	4X	3X	X	X	2X	10	40	45	5
27	m5i1t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
28	m5i2t1	X	2X	3X	3X	2X	2X	3X	2X	2X	3X	2X	3X	3X	2X	3X	2X	2X	3X	3X	2X	5	50	45	0
29	m5i2t2	2X	2X	3X	3X	2X	3X	3X	3X	3X	4X	3X	3X	4X	3X	4X	3X	4X	3X	3X	3X	0	15	65	20
30	m5i2t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
31	m6i1t1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
32	m6i1t2	X	X	X	X	X	2X	3X	2X	3X	3X	2X	3X	3X	3X	2X	3X	3X	2X	2X	3X	25	30	45	0
33	m6i1t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
34	m6i2t1	2X	2X	2X	X	2X	2X	2X	X	X	3X	2X	2X	X	X	2X	X	X	X	X	X	45	50	5	0
35	m6i2t2	X	X	X	X	X	3X	X	X	X	X	X	X	4X	3X	2X	2X	X	X	X	X	75	10	10	5
36	m6i2t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
37	m7i1t1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
38	m7i1t2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
39	m7i1t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
40	m7i2t1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
41	m7i2t2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0
42	m7i2t3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	100	0	0	0

ANEXO 34

CRECIMIENTO RADICULAR EN EL PERIODO DE ENRAIZAMIENTO

tratamiento		Datos Observados																		Porcentaje					
																				X	2X	3X	4X		
1	m1i1t1	X	3X	3X	X	X	2X	2X	2X	X	2X	3X	X	X	X	X	3X	X	X	3X	2X	50	25	25	0
2	m1i1t2	3X	3X	3X	3X	X	X	3X	X	4X	2X	2X	X	X	2X	X	X	2X	3X	3X	3X	35	20	40	5
3	m1i2t1	3X	2X	3X	3X	2X	2X	3X	3X	X	X	2X	3X	-	2X	-	2X	X	2X	3X	X	22	39	39	0
4	m1i2t2	4X	3X	4X	4X	4X	3X	4X	4X	2X	2X	2X	4X	3X	3X	3X	4X	4X	X	4X	2X	5	20	25	50
5	m2i1t1	2X	X	X	2X	X	2X	X	2X	X	X	2X	2X	2X	3X	3X	2X	X	3X	X	X	45	40	15	0
6	m2i1t2	X	X	X	X	X	X	X	X	2X	X	3X	2X	X	X	2X	2X	X	2X	2X	X	65	30	5	0
7	m2i2t1	3X	3X	3X	3X	-	-	-	-	-	-	-	-	2X	X	-	2X	2X	2X	3X	3X	9	36	55	0
8	m2i2t2	4X	4X	3X	2X	4X	4X	4X	2X	2X	4X	4X	3X	4X	4X	4X	-	X	2X	3X	2X	5	26	16	53
9	m3i1t1	3X	2X	3X	2X	2X	2X	2X	2X	X	2X	2X	2X	2X	2X	3X	2X	2X	2X	3X	X	10	70	20	0
10	m3i1t2	2X	2X	2X	2X	X	2X	X	X	X	X	3X	2X	X	2X	X	2X	2X	2X	3X	2X	35	55	10	0
11	m3i2t1	2X	2X	2X	2X	3X	2X	2X	2X	2X	2X	3X	X	2X	2X	3X	-	3X	2X	2X	2X	5	74	21	0
12	m3i2t2	3X	3X	3X	2X	2X	2X	3X	X	2X	3X	3X	3X	X	X	3X	3X	2X	4X	4X	3X	15	25	50	10
13	m4i1t1	2X	3X	3X	2X	4X	3X	3X	2X	3X	2X	3X	X	3X	3X	3X	3X	2X	3X	3X	2X	5	30	60	5
14	m4i1t2	3X	3X	3X	4X	4X	3X	4X	3X	3X	0	0	85	15											
15	m4i2t1	4X	3X	2X	X	4X	3X	3X	2X	-	-	2X	6	17	44	33									
16	m4i2t2	4X	4X	4X	4X	3X	3X	4X	2X	3X	3X	3X	3X	3X	3X	4X	4X	3X	4X	4X	3X	0	5	50	45
17	m5i1t1	3X	2X	3X	3X	X	3X	2X	2X	2X	2X	3X	2X	2X	2X	2X	3X	2X	2X	2X	3X	5	60	35	0
18	m5i1t2	3X	4X	4X	3X	3X	4X	3X	3X	3X	3X	4X	4X	4X	4X	3X	4X	4X	4X	3X	4X	0	0	45	55
19	m5i2t1	2X	2X	3X	2X	4X	3X	2X	3X	2X	3X	3X	3X	-	-	-	-	-	-	-	-	0	42	50	8
20	m5i2t2	4X	4X	3X	3X	3X	2X	3X	3X	3X	4X	4X	4X	2X	4X	2X	2X	4X	4X	3X	3X	0	20	40	40
21	m6i1t1	X	3X	2X	3X	2X	3X	3X	3X	2X	3X	4X	2X	3X	3X	2X	X	3X	4X	4X	4X	10	25	45	20
22	m6i1t2	3X	4X	4X	4X	2X	4X	4X	4X	4X	2X	4X	3X	4X	4X	4X	4X	3X	2X	3X	X	5	15	20	60
23	m6i2t1	3X	2X	3X	2X	4X	3X	4X	4X	3X	4X	4X	2X	3X	3X	0	15	60	25						
24	m6i2t2	4X	3X	3X	3X	2X	4X	3X	4X	2X	2X	3X	3X	3X	4X	3X	3X	4X	3X	3X	3X	0	15	60	25
25	m7i1t1	2X	2X	2X	3X	3X	3X	3X	2X	2X	3X	2X	3X	3X	2X	3X	2X	2X	2X	3X	3X	0	50	50	0
26	m7i1t2	3X	4X	3X	3X	2X	4X	3X	3X	3X	4X	4X	3X	4X	3X	4X	4X	2X	4X	3X	3X	0	10	50	40
27	m7i2t1	3X	2X	3X	2X	2X	3X	4X	3X	2X	2X	2X	2X	2X	X	2X	-	2X	2X	2X	2X	5	68	21	5
28	m7i2t2	X	X	X	X	X	X	X	X	2X	X	X	50	50	0	0									

BIBLIOGRAFIA

1. AGRIOS G. Fitopatología, Ed. Limusa, México1995, 648p
2. BENALCAZAR SYLVIO, ARCILA I, JORGE A, REICHEL H, NARVAEZ J.
Tecnología del eje cafetero. Efecto del Virus del Mosaico del Pepino (CMV), sobre los parámetros de crecimiento, desarrollo y producción del clon de banano Gros Michel. Tercer informe técnico 1994-1996, p88-93.
3. CARUANA M, JAMES D, PHILIPPE L, LOCKHART B, REICHEL H, THOMAS J, Infomusa. INIBAP. "El BSV y otros virus (potex) en el movimiento de intercambio de germoplasma "Vol. 9.N:2, diciembre 2000,p14
4. CARUANA M, Virosis en Musaceas, Acorbat-Ecuador 1998, p 693-705
5. CARUANA M, JAMES D, DALONY M, PHILIPPE L, LOCKHART B, REICHEL H, infomusa. INIBAP, "El BSV y otros virus (potex) en el

movimiento de intercambio de germoplasma”, Vol. 9, N 2,
diciembre 2000, p14-16

6. CHAVEZ M. Bioquímica. VLIR –ESPOL, Guayaquil, 250 p.
7. DANIELLS J, THOMAS.J, SMITH. M, infomusa, INIBAP. Virus del rayado,
confirmada a través de la semilla. Vol4, N 1,p7
8. DANIELLS J, GEERING A, THOMAS J, infomusa, INIBAP, "Investigaciones
sobre el virus del rayado en Australia.1998, Vol. 7 , N 2,p20-21
9. DAHAL G, HUGHES J. D. THOTTAPPILLY G. AND LOCKHART. Effect of
temperature on symptom expression and reliability of banana
streak badnavirus detection in naturally infected plantain and
banana (Musa spp.)
10. DE ROBERTIS y DE ROBERTIS (h). "Biología celular y molecular, ed. El
Ateneo, Buenos Aires,1998, 625p.

11. ESCOBAR W, El Agro. "Biotecnología y cultivo de tejidos". Vol. 30, Noviembre 1998, p25.
12. ESPINOZA A, PAZ L, INIAP. N:8, Diciembre 1996,p27
13. FRISON. E. A. and SHARROCK. S. L. INIBAP "Banana Streak Virus a. Unique. Musa interacción? , 1998,70p
14. GEERING A. D. W. AND THOMAS J.E Search for alternative hosts of banana bunchy Top virus in Australia.
15. HELLIOT B, PANIS B, LOCICEROA, REYNIERS K, SWENNEN R, LEPOIVRE P, Infomusa, INIBAP, Eliminación de las enfermedades del banano y plátano (Musa spp.) mediante crioconservación", Vol. 10, N 1, junio 2001.
16. HULL R, CROUCH J, FRISON E, OLSZEWSKI N, VUYLSTEKE D, Infomusa. INIBAP. "Taller sobre el Virus del Rayado del Banano. "Vol. 5. N: 2, diciembre 1996, p32

17. IGLESIAS L. Genética. VLIR –ESPOL. Guayaquil, 1999,200 p
18. JASUPI A, Instituto Higiene Leopoldo Izquieta, Guayaquil,2001.
19. J. E. THOMAS, A. D. W. GEERING, J. W. DANIELLS, L. A. MICHAEL,
INIBAP, "El virus del rayado en Australia",1998, p15-19
20. JONES, LOCKHART B, INIBAP, "Enfermedades causada por el virus del
rayado del banano, N 1,1993,1p
21. JONES R, Involved en the transfer of banana and plantain Germplasm.
France, p85-105
22. JONES, CARUANA M, INIBAP. "Sceening Banana and Plantain Germplasm
at INIBAP 'S virus indexing centers". France, p99-105.
23. JEFF D, ANDREW G, JHON T, Infomusa, INIBAP. Virus del Rayado,
confirmada su transmisión a través de las semillas. Vol. 4. N: 1, p7
24. KORNEVA S. Cultivo de tejido vegetal. VLIR-ESPOL, Guayaquil, 1999.

25. KLUG W. S, CUMNINGS M. R. Conceptos de Genética.1999. Prentice Hall.
Iberia, Madrid.
26. LOCKHART B, INIBAP .Reporte anual 1994, p20-22.
27. LOCKHART. B. Purification and Serology of a Bacilliform virus Associated
with Banana Streak Disease. Phytopathology Society, 1986,
p995-998.
28. LOCKHART B. KIRATIYAANGUL K, JONES P, ENG L DESILVA P.
Identification of Piper yellow mottle virus, a mealybug-transmitted
badnavirus Infecting Piper spp, in Southeast Asia
29. LOPEZ A, ESPINOZA J, INPOFOS. Manual de nutrición y fertilización del
banano, Costa Rica,1995,82p
30. MARIBONA R, El Agro. La Biotecnología se aplica en banano, ESPOL. Vol.
61, junio 2001,p10-12

31. MARIBONA R. Biología molecular, VLIR-ESPOL, Guayaquil, 1999, 212p.
32. MATTHEWS, R. E. F. Plant virology, third edition, EE. UU, 1991, 833p
33. MENDOZA DE GYVES EMILIO. Agrobiotecnología, Ed. Iberoamérica, México, 1994,78p
34. MURASHIGE H. AND SKOOG. Physiologia Plantarum 1962.
35. OTERO ANSELMO. Inmunología .VLIR –ESPOL. Guayaquil,1999, 174p
36. PERALTA. E. Avances y perspectivas en la detección y manejo de enfermedades de las plantas, Filatec S.A-ESPOL, Guayaquil, 1998, 34p
37. RAMIREZ P, RIVERO C, Enfermedades virales en banano y plátano, .Acorbat-México, 1991, p223-230.
38. REICHEL H, BELALCACA ZAR S, MUNERA G, AREVALO E, NARVAEZ J, Infomusa INIBAP. Confirmada la presencia de la enfermedad del

rayado del banano en cultivo de plátanos (*Musa AAB*, Simmonds), caña de azúcar (*saccharum officinarum*) y achira (*canna edulis*) en Colombia, Vol. 6 N:1, julio 1997, p9-12

39. REYES W. (Comunicación personal). INIAP-Pichilingue 1997

40. RIVERA C, RAMIREZ P, PEREIRA R. Preliminary characterization of viruses Infecting Banana in Costa Rica, p63-68.

41. RIZZO P. La ingeniería genética y la agricultura sustentable en el Ecuador. Guayaquil, p9-14

42. SINGH Z, JONES R, JONES, M. G. MUSARAMA. INIBAP. Boletín bibliográfico internacional sobre banano y plátanos. Vol. 10, #1, junio 1997, p14-18

43. SOTO M, Bananos, Cultivo y Comercialización, 2da edición, Costa Rica, 1992, p106-203.

44. TSITSI NDOWORA, GANESH DAHAL, DARYLE LAFLEUR, GLYN HARPER, ROGER HULL, NEILL E, OLSZCWSKI y LOCKHART B.

Infomusa, INIBAP. "Expresión episomal inducida por el estrés de la secuencia del badnavirus del rayado del banano (BSV) integradas en el genoma de Musa "Vol. 8, N:1, junio 1999, p11

45. W. K. TUSHMEREIRWE, E. B. KARAMURA, R. KARYEIJA Infomusa INIBAP
"Asociación del virus del rayado del banano(BSV) y un virus filiforme no identificado de los bananos de los altiplanos de Uganda
" Vol. 5, N: 1, junio 1996, p9