

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la**

Producción

**Comparación de la dinámica de crecimiento de tres aislados
de *Mycosphaerella fijiensis* y el efecto tóxico en hojas de
banano.**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Presentada por:

Juan José Aycart M.

GUAYAQUIL- ECUADOR

Año: 2003

A G R A D E C I M I E N T O

Agradezco a todas las
personas que
colaboraron con el
presente trabajo.

DEDICATORIA

A Danielle, Isabel y

Anna María

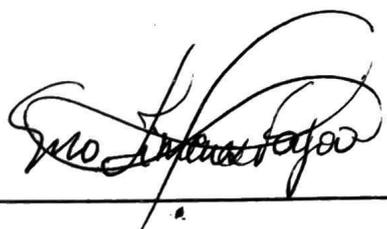
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ing. Francisco Andrade S.
DECANO DE LA FIMCP



PhD. Rodolfo Maribona H
DIRECTOR DE TESIS



MsC Maria Isabel Jiménez F.
VOCAL



Ing. Felipe Mendoza G.
VOCAL



DECLARACIÓN EXPRESA

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



Juan José Aycart M.

RESUMEN

Una de las enfermedades foliares más importantes en el cultivo del banano es la Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la dinámica de crecimiento y actividad biológica de tres aislamientos provenientes de zonas bananeras distintas y las posibles variaciones de la patogenicidad del hongo en genotipos de Musa con diferente grado de resistencia. Las variables estudiadas fueron: índice de peso seco a las 48 horas del micelio, conductimetría del extracto crudo toxico. Las curvas de crecimiento del patógeno mostraron diferencias en su dinámica de crecimiento pero la actividad de al extracto crudo no mostró actividad diferenciada para los diferentes genotipos estudiados..

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	I
INDICE GENERAL.....	II
ABREVIATURAS.....	IV
SIMBOLOGÍA.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	VI
INTRODUCCION.....	1
 CAPÍTULO I:	
1. GENERALIDADES	
1.1. Origen y distribución de la Sigatoka negra.....	4
1.2. Importancia Económica.....	8
1.3. Sintomatología.....	13

CAPÍTULO II:**2. FACTORES RELACIONADOS CON LA PATOGÉNESIS**

2.1. Los concentrados tóxicos y la Patogénesis.....	18
2.2.Mecanismos de acción de los exudados de <i>Mycosphaerella</i> spp	21
2.3.Uso de los extractos en la selección de bananos.....	25

CAPÍTULO III:**3. METODOLOGÍA Y EVALUACIÓN**

3.1. Variables estudiadas.....	32
3.2. Diseño experimental.....	43

CAPÍTULO IV:**4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN44****CAPÍTULO V:****5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....57****BIBLIOGRAFÍA.....62**

ABREVIATURAS

AAA	Triplóide Acuminata
CORBANA	Corporación Bananera Nacional (Costa Rica)
ECT	Extracto Crudo Tóxico
Hs	Hipersensible

SIMBOLOGIA

Kg	Kilogramos
Ha	Hectárea
g	gramos
l	Litro
mL	mililitro
cm	centímetro
r.p.m.	Revoluciones por minuto
h	horas
p.p.m.	Partes por millón
nm	nanómetros
μm	micrómetros
μl	microlitros

INDICE DE LAS FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Curva de crecimiento de Tres Aislados Monospóricos de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	44
Figura 2.	Azucres solubles en los medios líquidos procedentes de los aislamientos estudiados por refractometría.....	45
Figura 3.	Dendograma de 7 variables (tiempo de crecimiento), utilizando el Modelo Manhattan city block.....	49
Figura 4.	Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de Calcuta 4 frente a diferentes aislados.....	50
Figura 5.	Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de Yangambi Km. 5 frente a diferentes aislados	51
Figura 6.	Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de FHIA 3 frente a diferentes aislados.....	51
Figura 7.	Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de IRFA 905 frente a diferentes aislados.....	52
Figura 8.	Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de Gran Enano frente a diferentes aislados.....	52
Figura 9.	Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de Pisang Berlín frente a diferentes aislados.....	53

INTRODUCCIÓN

El cultivo de banano alcanza altas producciones en una diversidad de climas, a los que se ve sometido, en la explotación agrícola. Pero es susceptible a un amplio rango de enfermedades foliares, la más severa de estas es la Sigatoka Negra. Debido a que los controles químicos para esta enfermedad se han tornado demasiado costosos y afectan al medio ambiente, el interés de algunos resultados prometedores ha sido enfocado en el campo del mejoramiento genético.

Ecuador al igual que otros países, se ha visto afectado por la presencia de la enfermedad. Por lo que la investigación de los diferentes aspectos involucrados en el establecimiento de la relación patógeno-hospedero se hacen necesarios para contar con metodologías que ayuden en la búsqueda de genotipos tolerantes o resistentes a la enfermedad. El centro de investigaciones Biotecnológicas de la ESPOL trabaja en el área de Protección de plantas en la investigación y establecimiento de un banco de poblaciones del patógeno, ensayos a nivel de laboratorio, invernadero y campo de un grupo de accesiones con diferente expresión, que ayuden a entender las relaciones establecidas en el desarrollo de la enfermedad. Este estudio preliminar busco establecer relaciones en el crecimiento del patógeno

y la producción de metabolitos tóxicos, que pueda ser aplicado al cribado de genotipos de banano en búsqueda de expresiones rápidas y sencillas al hongo causante de esta enfermedad: ***M. fijiensis***.

Objetivos

General:

Estudiar la dinámica de crecimiento de poblaciones de ***Mycosphaerella fijiensis***, y conocer el efecto del extracto crudo tóxico (ECT) sobre discos foliares de diferentes genotipos de Musa.

Específicos:

1. Determinar las curvas de crecimiento, en medios de cultivos líquidos en suspensión, de tres aislamientos de ***Mycosphaerella fijiensis***.
2. Conocer la dinámica de producción de extracto crudo tóxico de los aislamientos fúngicos durante su crecimiento *in vitro* en medio de cultivos líquidos en suspensiones.
3. Evaluar los efectos del ECT en discos de hojas de genotipos de Musa resistentes, tolerantes y susceptibles.

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES.

1.1 Origen y Distribución de la Sigatoka negra.

La Sigatoka Negra fue reportada por primera vez en febrero de 1963, en la isla Viti Levu en Fiji, desde donde se diseminó rápidamente. Esta enfermedad desplazó a la Sigatoka amarilla en los lugares donde se estableció y desarrolló (Jones, 1999). Según Johnston (1965) y Graham (1969) la Sigatoka negra estaba presente en los Estados Federados de Micronesia, Nueva Caledonia, Papua Nueva Guinea, Filipinas, Samoa, las islas Salomón, Tahití, Taiwán, Tonga, Vanuatu y el oeste de Malasia, desde que fuera reportada inicialmente. En la misma fecha Meredith y Lawrence (1969) identificaron la enfermedad

en las islas de Hawai, Stover (1976) reporto su presencia en las islas de Cook y Niue. La amplitud de su distribución en los alrededores del Pacífico sugieren que la enfermedad estuvo presente antes de ser descubierta en Fiji. En 1970 la enfermedad fue encontrada en las Filipinas en diferentes cultivos de banano, pero la evidencia sugiere su existencia desde 1964, debido a que fácilmente se la confundía con la Sigatoka amarilla. Después de revisar el viejo Herbario de especímenes de lesiones foliares, Stover (1976) concluyó, por la evidencia, que la enfermedad debió estar presente en Papua Guinea (1957) y en Taiwán mucho más temprano (1927). Por lo que analizando en la información recopilada dedujo que la enfermedad debió originarse en la zona de Nueva Guinea y las islas Salomón.

Los reportes en la literatura sugieren que la Sigatoka negra estaba presente en Singapur, el oeste de Malasia y Tailandia por algún tiempo anterior a 1964. A pesar de esto no se la ha reportado cerca de Kuala Lumpur y Mekala en el este de Malasia, o cerca de Bangkok y Paknchong en Tailandia hasta 1988 (Jones, 1999).

En los lugares de Asia donde se encontró a la Sigatoka Negra, se podía observar que esta no se comportaba de manera dominante como en América y África. En el Norte de Vietnam no se observa al

cultivo susceptible, subgrupo Cavendish (AAA), atacado por la Sigatoka Negra en toda su área foliar.

En las Filipinas aun se observa a la Sigatoka Amarilla, a pesar de la introducción de la Sigatoka Negra. Este fenómeno esta relacionado con los diferentes grados de resistencia de los bananos locales y por la competencia con otras enfermedades foliares. La mancha producida por Septoria en Tailandia ha remplazado a la Sigatoka Negra.

La distribución de la enfermedad en América Latina y el Caribe esta bien documentada. Esta apareció por primera vez en Honduras en 1972, siendo encontrada junto con la Sigatoka Amarilla en la colección de germoplasma de la United Fruit Company en la Lima. Esta colección era utilizada para el estudio de la Sigatoka amarilla y por lo que siempre permaneció sin controles químicos. Pero analizando transparencias de color tomadas a la colección se pudo identificar la presencia de la enfermedad en 1969, por lo que se puede deducir que fue introducida antes y permaneció oculta (Jones, 1999).

Después de la detección de la Sigatoka negra, poco a poco se pudo ver como esta se incrementaba en plantaciones comerciales, finalmente se evidenciaron ataques severos; para diciembre de 1973 a

febrero de 1974, ya se contaba con un área de 12.000 hectáreas afectadas. Stover, Dickson (1976) y Buddenhagen (1987) postularon que cuando la Sigatoka negra se estableció por primera vez en el valle de Ulúa, el patógeno no contaba con el suficiente nivel de virulencia para remplazar a la Sigatoka Amarilla, y solo después de alcanzar este nivel de virulencia pudo hacerse dominante y distribuirse rápidamente. Mientras que el subgrupo Cavendish y los plátanos eran atacados por Sigatoka negra en las zonas bajas de Honduras se podía observar como la Sigatoka Amarilla seguía presente en plantaciones a altitudes mayores (Jones, 1999).

Entre los años 1973 y 1980, serios casos de ataques de Sigatoka negra fueron reportados en Belice, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica ; para 1981 la Sigatoka negra ya se encontraba en todos los Países entre México y Panamá pudiendo ser observado en algunas Zonas de Colombia. En 1987, la enfermedad fue detectada en el norte de Ecuador y en menos de cuatro años ya se encontraba en las zonas de producción bananera Sur de este país. Al Oeste de Venezuela y Bolivia, fue reportada en 1991, siendo Brasil, el último país sudamericano que reportó su presencia en 1998. (Infomusa, 1998).

1. 2. Importancia Económica de la Enfermedad.

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet es la enfermedad foliar con mayor importancia económica en Musa. Ésta, a diferencia de la Sigatoka Amarilla (*Mycosphaerella musicola*), puede causar pérdidas de hasta el 100% de la producción cuando no se toma ninguna medida de control (Pérez, 2000). Otro efecto de esta enfermedad, es la elevación de los costos de producción debido al intensivo uso de fungicidas, necesarios para su manejo, como en el caso de los países centroamericanos en los cuales se hace necesario más de 40 ciclos de fumigación al año. Esto significa cuatro veces más los ciclos necesarios para el control de la Sigatoka amarilla, causando pérdidas socio-económicas de gran importancia, en lugares donde el género Musa es un renglón importante en la alimentación y economía. La cantidad de recursos que el productor destina para adquirir infraestructura, equipos y agroquímicos necesarios para el combate de la enfermedad hacen que la actividad bananera, pierda cada vez mayor número de productores que no pueden afrontar los costos de la tecnificación y control químico (Marín, 1990).

Se estima que anualmente se usan más plaguicidas para la producción de banano de Exportación que en cualquier otro cultivo. En Costa Rica el costo anual del manejo de Sigatoka negra en los bananos de exportación esta sobre los 50 millones de dólares, convirtiéndose en el rubro más alto de la producción bananera. (Rosales, 1998).

Una vez que la enfermedad llega a un sector de explotación bananera, rápidamente alcanza niveles epidémicos. Las pérdidas que los exportadores sufren están bien documentadas, pero las sufridas por los pequeños agricultores son difícilmente estimables. Hasta antes de 1970 las enfermedades foliares no eran consideradas importantes, esto cambio cuando el patógeno alcanzó las zonas de amplia explotación. Debido a que el banano y el plátano son alimento de las masas sociales de más bajos recursos, esta enfermedad disminuye la oferta y disponibilidad de fruta; además, de un cambio en las prácticas culturales existentes. Muchos de estos productores tuvieron que salir del negocio de la exportación debido a que no podían afrontar con los elevados costos del control químico (Jones, 1999).

El control químico en general puede alcanzar más del 27% de los costos de producción. Desde 1972 hasta 1985, se ha estimado que el costo del control de la Sigatoka negra, en América Central y México, bordea los 350 millones de dólares anuales; estimando un aumento de 49 millones de dólares para 1995 (Strobel, 1992).

En el Ecuador, los problemas se agravan debido al aumento en los precios de los insumos, entre estos los fungicidas. Se considera que en poco tiempo mas, los pequeños productores desaparecerán junto con los medianos, sino evolucionan hacia haciendas de mayor productividad y tamaño, para mantener las ventajas competitivas (Chang, 2000). Para el mejor control de la enfermedad es necesario contar con un programa de manejo que no permita daños severos lo que traen como resultado perdida de la fruta por maduración, lo que la hace no idónea para su comercialización (Jones, 1999). Ecuador es un país que posee el grueso de su poder productivo repartido en mas de 4000 productores de fruta de exportación. Contraponiéndose con lo que se puede observar en Centroamérica y Colombia, que poseen su grueso de producción en manos de las transnacionales.

La presencia de esta dañina enfermedad, ha significado que la producción en el país varíe desde las 3000 cajas / ha hasta las 1500 cajas por hectárea. Para los pequeños agricultores (1-10 has) los costos de producción y mantenimiento son altos (Espinoza, 1998). En vista que esta enfermedad se relaciona con la expresión climática de la zona de producción, en dependencia a este factor, la Sigatoka negra puede mermar la producción agrícola bananera a extremos. Como ejemplo tenemos lo ocurrido en la época del fenómeno del niño en el año de 1998, cuando las pérdidas comparadas con el año de 1997 se elevaron hasta el 20 por ciento mensual. Claro está que en parte se debió a las pérdidas de las extensiones agrícolas, pero también al severo ataque de la enfermedad en cada sector (Tazan, 1999).

El mismo caso se registró en Costa Rica, que para el año de 1998 entre abril y mayo se notó un aumento en los niveles de infección de la enfermedad, al igual que en los meses de agosto y septiembre (Romero, 1990). Desde 1983, CORBANA mantuvo monitoreos mensuales del nivel de infección en algunas fincas bananeras, lo que permitió observar un patrón de infección, relacionado con las

variaciones del clima. Era frecuente observar fincas que eliminaban una importante cantidad de racimos, o bien los cortaban a una calibración menor para no perder la fruta, lo que implica una reducción en las cosechas, y una pérdida para el productor (Romero, 1990). Ecuador al igual que Costa Rica presenta una relación entre los parámetros climatológicos y el desarrollo de la enfermedad. Los resultados de investigaciones realizadas indican que una condición de depresión vegetativa en el periodo de junio a septiembre caracterizado por una “disminución térmica” y de heliofania disminuye la severidad de la enfermedad. Siendo así, ésta alcanza su mayor intensidad en el primer semestre del año, entre enero y abril, meses que se caracterizan por su alto nivel lluvioso. Esto también afecta los costos de producción del banano que para mantenerse en producción necesita de un número determinado de hojas funcionales, pudiendo acceder a los mejores precios de la fruta, que se encuentran entre la semana 3 a la 20 de cada año. Por lo que se incurre en fumigaciones con ciclos mas cortos, y labores culturales destinadas al control de la enfermedad.

Esta enfermedad pone en peligro la producción de un importante alimento, de las grandes masas de habitantes como lo es el plátano.

La mayoría de las plantaciones de este rubro, pertenecen a pequeños agricultores los cuales no efectúan un manejo químico de la enfermedad. En Costa Rica se efectuó un estudio que demostró que una plantación platanera con un control químico sólo producía 1.2 Kg. de plátano más en comparación con la platanera testigo sin tratamiento, lo que nos permite entender el porque de esta falta de manejo. Pero aunque, la diferencia podría engañarnos a simple vista, otros estudios arrojaron que plataneras con control tuvieron un retorno más rápido puesto que las plantas florecieron un mes antes y además la platanera sin control cosecho 38% menos racimos. La diferencia en calidad aunque no fue evaluada en el experimento si era notoriamente evidente (Marín et al, 1992).

1.3. Sintomatología.

En Hawai, Meredith y Lawrence en el año de 1969 describieron los síntomas de la enfermedad, la cual empieza como una pizca rojiza observada en la superficie de la hoja con una dimensión de 20 mm x 2 mm. Las manchas foliares eran más visibles en las hojas bajas que en las más jóvenes. En estados más avanzados se podían ver

las lesiones en la parte adaxial presentando un color café más oscuro y un halo gris en el interior de la mancha (Pérez, 1996).

Fouré, que para 1987 trabajaba en Sigatoka negra en África, identificó seis principales estados de evolución de lesiones foliares para Sigatoka negra. El primer estado precede al estado enunciado por Meredith. Es una mancha blanco amarillenta pequeñísima en el lado adaxial de la hoja. En el segundo estado la mancha se vuelve de color oscuro. Cuando el color en el lado adaxial se torna de café a negro, mientras que el del lado adaxial permanece café, se encuentra en el tercer estadio. Entonces posee entre 20 y 30 mm. La raya crece hasta hacerse una mancha elíptica en el cuarto estadio, que presenta además un borde acuoso pardo claro alrededor de la mancha. Cuando la mancha esta rodeada de un halo amarillento se encuentra en el quinto estadio. En el sexto estadio el centro de la mancha se hunde y se pone de color gris, por último la mancha esta de color negro rodeada de un ligero halo amarillo. (Jones, 1999; Pérez, 1996).

Los síntomas de la Sigatoka negra son más severos en las plantas con racimo en vista de que la producción de hojas ha cesado. Cuando la presión de inoculo es alta, es común observar plantas

susceptibles a la enfermedad que lleguen a la cosecha sin contar con hojas viables y funcionales. Se ha logrado observar diferencias evidentes en la evolución de los síntomas presentados por diferentes variedades de banano, con distintos grados de resistencia a la enfermedad (Jones, 1999).

De la observación de la respuesta de los diferentes genotipos a la enfermedad Fouré en el año de 1990 -1994 propuso tres tipos de reacciones del cultivo. El primer fenotipo presentaba una alta resistencia (HR) caracterizada por el bloqueo del desarrollo del patógeno en estadios tempranos. Esta reacción se acerca a la reacción por hipersensibilidad y el patógeno no logra desarrollarse para esporular. La resistencia de este tipo esta regulada por pocos genes de resistencia o por una relación gen por gen, conocida como resistencia vertical. Por sus características, este tipo de resistencia puede ser rápidamente superado por mutaciones en el patógeno.

El segundo fenotipo presenta una resistencia parcial al patógeno. En estas plantas el patógeno se desarrolla normalmente pero de una manera más lenta permitiendo la esporulación. La resistencia de

este tipo esta controlada por muchos genes, por lo que se la conoce como resistencia horizontal.

Existe un gran número de grados en este fenotipo, desde las tolerantes hasta llegar casi a la completa susceptibilidad. El tercer fenotipo posee una expresión de susceptibilidad, caracterizado por un normal y acelerado desarrollo del patógeno. Este fenotipo presenta una rápida necrosis y una profusa esporulación en condiciones medio ambientalmente favorables (Jones, 1999; Riveros, 1996).

En el ámbito citológico, el análisis de las interacciones de ***Mycosphaerella fijiensis*** y Musa arrojaron la conclusión de que éste es un parásito Biotrófico, colonizador de los espacios intercelulares y de las células del mesófilo sin previa formación de haustoria. Por otra parte la necrosis observada en estadios tempranos de las células guardas son asociadas a esa relación de incompatibilidad que se puede llegar a presentar con los genotipos de comportamiento hipersensibles. Se piensa que este comportamiento esta ligado a relaciones de gen por gen. Donde el producto de un gen no virulento del patógeno desencadena una

reacción de hipersensibilidad con características de resistencia dominante (Riveros, 1996).

CAPITULO 2

2. FACTORES RELACIONADOS CON LA PATOGÉNESIS DE *Mycosphaerella fijiensis*.

2.1 Los Concentrados Tóxicos como factores relacionados a la patogénesis.

Debido a lo importante de la enfermedad en los cultivos comerciales en América se comenzó el estudio del agente causal y el modo de acción. De tal forma que se permitiera entender los aspectos de la patogenicidad involucrados en el proceso infeccioso. Uno de estos aspectos es el estudio de metabolitos tóxicos relacionados con la patogénesis. Estudios preliminares, reportados en el año de 1989,

indican que los síntomas de la enfermedad podían ser inducidos por la acción de los extractos crudos tóxicos, sugiriendo la importancia de estos en el desarrollo de la enfermedad (Upadhyay, 1991). Varios han sido los compuestos relacionados con la formación de lesiones foliares en banano. En el mismo año Strobel, *et al* evaluaron extractos tóxicos a los 10, 15, 20 y 28 días de cultivo fúngico, y en sus resultados identificaron más de un metabolito en relación con el crecimiento del hongo. Por lo que el uso de los extractos tóxicos se presenta como una opción rápida en la evaluación de variedades y materiales germoplásmicos.

Las toxinas específicas, muy pocas excepciones, son compuestos de bajo peso molecular con diferentes estructuras, que presentan un rol importante en la patogenia. La especificidad de la toxina, descansa en que ésta causa alteraciones en un rango específico de especies, variedades o genotipos sensibles a la misma. A pesar de la naturaleza de estos compuestos, es común que estén controlados por pocos genes del huésped. El estudio de los compuestos tóxicos significa un avance en la comprensión de la patogenia de la mayoría de las enfermedades y un punto a tomarse en cuenta en el momento de querer montar un programa de mejoramiento genético. La

identificación de los compuestos fitotóxicos lleva a entender las estrategias de ataque con las que cuenta el patógeno (Walton, 1996).

Algunos han sido los estudios relacionados con la importancia de las toxinas en la relación hongo patógeno - hospedero. El estudio de la liberación de electrolitos en discos foliares incubados en toxinas, se presenta como un ensayo que provee información de cómo una célula moribunda logra mantener la permeabilidad de su membrana frente a un extracto crudo tóxico (Harlenmania, 1997). Más aún, ha sido postulado que la toxina posee un efecto biológico mayor relacionado con la supervivencia del hongo patógeno mismo. Al afectarse la integridad de la membrana celular, azúcares y aminoácidos de bajo peso molecular pueden pasar fácilmente de la célula al apoplasto, donde fácilmente son absorbidos por el micelio del hongo (Walton, 1996). Por esta razón la mayoría de los hongos que atacan al tejido foliar producen toxinas hospedero específicas que aceleren la liberación de nutrimentos al apoplasto. Existen varias respuestas celulares a la presencia de toxinas en el medio. Entre las reportadas en la literatura se encuentran activación de liberación de electrolitos como potasio y la alcalinización del medio extracelular (Walton, 1996). A pesar del nombre, no todas las toxinas son tóxicas en el sentido de causar la muerte celular, la mayoría de las toxinas específicas causan disfunciones celulares. Aun así, se conoce de que algunas toxinas

específicas actúan como inductores de la apoptosis celular, siendo relacionado fuertemente con el estado de resistencia del huésped, la cual muchas veces es una relación de gen por gen, entre el patógeno y el huésped, llevando a una respuesta de incompatibilidad o hipersensibilidad (Walton, 1996).

El rol de los extractos crudos y de las toxinas se evalúa determinando las relaciones existentes entre la producción de toxina y la patogenicidad del organismo frente a la sensibilidad de los genotipos de banano. El uso de estos extractos tóxicos ha permitido constatar mas de una vez su papel de determinantes secundarios de la patogenicidad. Para analizar este aspecto la medición de electrolitos liberados frente a la acción de estos metabolitos tóxicos se presenta como uno de los ensayos más sensibles para este propósito.

2.2 Mecanismos de acción de los exudados de *Mycosphaerella*.

En los diferentes individuos de una especie existen distintos rangos de resistencia a enfermedades. En este campo se conoce de resistencias y susceptibilidades específicas a nivel de especie. Existen diferencias citológicas obvias para el caso de la resistencia a

hongos patógenos. Esta relación fue estudiada en primera instancia en 1956 (Flor, 1956), de donde surge la hipótesis del gen por gen, la cual postula que para cada gen de resistencia en la planta existirá un gen de patogenicidad en el hospedero (Dixon, 1994).

De esta forma la planta puede poseer herramientas que le permitan detectar al patógeno, para interferir con su desarrollo. En este sentido la planta debe tener la capacidad de responder a la presencia del patógeno, de forma física o bioquímica. De ser una respuesta bioquímica, que implique la expresión de genes, podría ser una “respuesta constitutiva o inducida”. La respuesta es inducida solo en la presencia del patógeno y debe ser desencadenada por un inductor del patógeno. De tal forma que en un modelo simple este inductor específico del hospedero pueda unirse a un receptor en la célula y desencadenar las respuestas que conlleven a la producción de una respuesta. (Innes, 1995).

Los extractos crudos de los cultivos líquidos de *Mycosphaerella fijiensis*, poseen todos los exudados del hongo producidos durante el crecimiento, por lo que comprobar la acción de éstos sobre la membrana celular de discos foliares nos informará de la acción que

éste tiene en los cambios de permeabilidad e integridad de las mismas. Es difícil de pensar que los exudados tóxicos solos pudieran reproducir las lesiones en horas, cuando en campo toma semanas la aparición de lesiones en las hojas. Por esto se infiere que los exudados poseen una acción distinta. Relacionada evidentemente con la evolución de lesiones en la patogenia (Strobel, 1992).

La purificación de las toxinas de los extractos crudos demostró que los metabolitos tóxicos de *Mycosphaerella fijiensis*, pertenecían a una vía de síntesis muy parecida a la de la melanina. La melanina es necesaria en la pared celular para proteger al hongo de la radiación ultravioleta y desecación, pero además este compuesto es sumamente importante en la patogenicidad; por lo que experimentos utilizando un inhibidor de la melanina, aumenta la cantidad de metabolitos de esta vía incompleta los cuales son tóxicos. De esta manera aumenta la virulencia del patógeno al incrementar la producción de micotoxinas (Upadhyay, 1990; Strobel, 1992).

Los estudios hechos por Harlenmania en 1997 lograron demostrar la acción de la los concentrados tóxicos en los tejidos foliares de banano. Al medirse la fluorescencia de la clorofila se pudo observar un

considerable decrecimiento. Lo que se traduce en una pérdida de vitalidad en la hoja. Estudios preliminares utilizando microscopía electrónica lograron detectar alteraciones en los cloroplastos a la hora de incubación con el extracto crudo sugiriendo que uno de los primeros sitios afectados por la acción de los extractos crudos tóxicos eran los cloroplastos. Además se pudo observar que el tipo de tejido al que la toxina ataca con mayor agresividad son las células mesófilas pues la dosis letal media en suspensiones celulares es de 28 ppm, mientras que en suspensiones de celular embriogénicas era de 539 ppm (Harlenmania, 1997).

Por lo expuesto, la toxina secretada por los hongos patógenos puede tanto destruir a las células, como modificar su metabolismo en su favor. Debido a ello las plantas sensibles a la toxina sufrirán la acción dirigida por estas moléculas tóxicas en una reacción compatible, mientras que las células con reacciones incompatibles poseerán la capacidad de inactivar a la toxina, siendo de cierta manera una respuesta desintoxicante. Es esta respuesta incompatible, la que desencadena mecanismos de defensa en la planta, debido a que la planta ya reconoció la presencia del patógeno (Hoss, 1998).

Las toxinas de **Mycosphaerella** presentan una especificidad para banano a bajas concentraciones, causando lesiones necróticas solo en musa y no en cultivos como arroz, maíz, cebada, algodón etc. La acción de la fijiensina por ejemplo presenta una selectividad específica pero no presenta diferencia en respuesta entre diferentes cultivos de banano estudiados (Upadyah, 1990).

A pesar de todo muy poca es la información que se posee del patosistema de **Mycosphaerella**, por otro lado no se ha caracterizado suficientemente ni las reacciones de la planta hospedera frente al patógeno, ni su patogenicidad al atacar. Una importancia especial se le ha dado como ya se explicó a sustancias secundarias sintetizadas por el hongo en el metabolismo de policetidos, asignándoseles a estas un rol específico en la patosistema (Hoss, 1998).

2.3 Uso de los extractos en la selección de banano.

El fitomejoramiento del banano tuvo sus orígenes en 1922, en el colegio imperial de agricultura tropical en Trinidad, desde entonces los objetivos del mejoramiento genético han cambiado mucho. Cuando apareció la primera enfermedad que puso en evidencia lo dañino del

monocultivo, se hizo evidente que era necesario avanzar en programas de mejoramiento genético que buscaran plantas resistentes a las enfermedades de banano existentes. Este fue el caso del mal de panamá, que prácticamente erradicó la producción del 'Gros Michel'. Con la aparición de la Sigatoka negra los programas de mejoramiento cambiaron el agente de selección, pero continuaron con el modelo de búsqueda de plantas resistentes a la enfermedad. Existen varias fuentes de resistencia en algunas de las especies de *Acuminata*, por lo que los mejoradores genéticos concluyen que es importantísimo el poseer cultivares con una mayor diversidad genética para la protección contra posibles enfermedades (Rowe, 1985).

Debido a lo importante de la enfermedad en el cultivo de banano, y tomando en cuenta que el control químico efectuado posee un impacto severo al medio ambiente, se hace necesario el poder agilizar la evaluación de los materiales producidos en un programa de mejoramiento. El pesquisaje de las variedades y materiales germoplasmicos nuevos puede ser agotador y tedioso si se lleva a cabo bajo condiciones naturales. Las condiciones ambientales ejercen un poderoso efecto en el desarrollo de la enfermedad, se ha observado que el coeficiente de velocidad del crecimiento del tubo germinativo varia con la temperatura del medio ambiente (Pérez,

1996). Por lo que la velocidad de la evolución de la enfermedad desde la llegada de las ascosporas a la hoja no se puede comparar si los rangos climáticos varían de un sector a otro, y además varían entre la época seca y la de lluvias.

Cuando se desea caracterizar completamente el grado de resistencia que posee cierto material germoplásmico frente a la enfermedad, se recurre a otras herramientas que ayuden a completar el importante monitoreo de la resistencia en campo. Por lo que algunos ensayos han sido desarrollados con el objetivo de poder tener esta información en un tiempo mas corto y con menos trabajo.

Desde los primeros estudios en 1989 se ha investigado a las toxinas de *Mycosphaerella fijiensis* como base de criterio para poder identificar materiales germoplásmicos con diferente respuesta al patógeno. Poco a poco se ha llegado a comprender la importancia de las mismas en relación con el desarrollo de las lesiones foliares que restan capacidad fotosintética a la planta. Estudios recientes demostraron que el uso de las toxinas como criterio de búsqueda en la resistencia de banano frente a *Mycosphaerella* posee un alto grado

de significancia. Debido a la naturaleza hospedero específico de la toxina (Ross, 1999).

Mycosphaerella fijiensis, produce más de una toxina durante su proceso patogénico, algunas de estas no se presentan al mismo tiempo. Por lo que se presenta la incógnita de saber en que preciso momento de su evolución es más agresiva. Debido a esto se recurren al cultivo de los microorganismos en medios líquidos, en los cuales se puede investigar su actividad biológica en las diferentes etapas de su crecimiento. De esta forma se determina la relación entre la dinámica de crecimiento del microorganismo y su actividad biológica en la patogénesis. Estos resultados necesitarán que sean evaluados en un rango amplio de hospederos, para así al analizar varios aislados del patógeno se pueda identificar las diferencias existentes en la respuesta al microorganismo (Innes, R 1995). Para no tan solo identificar el grado de agresividad del patógeno, sino también, cambios en la respuesta de un rango de hospederos, con lo que se puede avanzar mucho mas en la caracterización de los mecanismos de la patogenia, y también en la duración de la resistencia en variedades probadas (Parleviet, 1995).

En un programa de mejoramiento genético se debe probar a los materiales germoplásmicos mejorados frente al patógeno. Por lo que en primer lugar debe tener en cuenta una etapa de creación de variabilidad genética y el establecimiento de un protocolo preciso de selección capaz de identificar los individuos resistentes de una población. Estos dos aspectos requieren un conocimiento profundo de la estructura de las poblaciones patogénicas con el fin de poder de lograr una resistencia durable.

La selección en campo solo se fundamenta en la observación de las lesiones, siendo que estas se relacionan con aspectos físicos y agro ecológicos (Espinosa, 1998), ubicándose en el campo de lo meramente descriptivo sin profundizar en el funcionamiento de la planta ni de la población de patógeno ni mucho menos, profundizar en la relación huésped - patógeno que afecta la expresión de resistencia de la planta. Esta dificultad que subyace en los experimentos en campo ha obligado a desarrollar metodologías modernas que permitan simplificar el sistema experimental bajo condiciones de laboratorio.

Dentro de los múltiples posibles factores que inciden en el desarrollo de la enfermedad, se trabaja con uno, el cual actúa en primer lugar

como agente de selección en un programa que busque resistencia a una enfermedad específica. Se deben involucrar en el proceso de selección todas las variantes que existan dentro de la relación planta patógeno. Teniendo en cuenta la posibilidad de diferencias entre las poblaciones de un patógeno, se debe enfrentar a estos materiales germoplásmicos a un rango representativo de la población del patógeno. Además de caracterizando al material en su grado de resistencia frente a las poblaciones del patógeno, seleccionando las que presenten una resistencia horizontal, en vista que una variedad mejorada puede en pocos años perder su resistencia debido a la aparición de cepas más virulentas o razas del patógeno.

En este aspecto el empleo de los extractos crudos tóxicos de diferentes edades de *M. fijiensis*, posee una relevancia importante, debido a que los nuevos materiales producidos en un programa de mejoramiento se ven desafiados tanto por las toxinas como otros metabolitos del hongo. Pudiendo ser estos desechos, elicitores, y otras sustancias excretadas por el patógeno. Debido a la naturaleza bio-necrotrofa de *M. fijiensis* su comportamiento en la patogenia está dado por diferentes factores que difícilmente se pueden controlar. Estos pueden ser obviados al estudiarse microorganismos en cultivos líquidos bajo condiciones controladas, y utilizando los extractos crudos

tóxicos en los estudios de resistencia evaluando materiales germoplasmicos con diferente expresión.

Varios han sido los ensayos con los extractos crudos tóxicos pero el que más sensibilidad reporta es la medición de la liberación de electrolitos. Los resultados de la evaluación utilizando concentrados tóxicos en la liberación de electrolitos se debe correlacionar con parámetros de infección en campo, con lo que se podría conocer cuan susceptible es una variedad y si en campo se obtendrá los mismos resultados que en laboratorio. Estas herramientas deben ser correctamente utilizadas en los programas de mejoramiento teniendo en cuenta que el banano y el plátano son las principales fuentes de trabajo y alimentación de las masas rurales y de los centros de abastos. La vía más económica y ecológicamente más segura contra la lucha contra la Sigatoka es el uso de variedades resistentes siempre que sea factible. Es además la única vía asequible para los pequeños agricultores sin medios para sufragar los costos de protección química (Pérez, 1996).

CAPITULO 3

3. METODOLOGÍA Y EVALUACIÓN.

Ubicación del experimento

El ensayo fue realizado en el Centro de Biotecnología de la Espol (CIBE), en el área de fitopatología. El laboratorio se encuentra en la ciudad de Guayaquil, en el Campus Politécnico Prosperina, a 35 metros sobre el nivel del mar.

3.1. Variables estudiadas

Los parámetros estudiados en el presente trabajo se resumen en los siguientes;

Peso del micelio seco (28 °C, por 48 horas).

El micelio se filtro de los cultivos agitados, con un papel filtro durante 30 minutos. Acto seguido se dejo secando la muestra en un horno a 28 °C centígrados, durante 48 horas. Pasado el periodo se peso en una balanza analítica y se registro los datos.

pH del medio.

Después de separar el micelio de los medios líquidos de las tres replicas, se midió el pH del sobrenadante. Los resultados se tabularon junto con los pesos de las muestras.

Evaluación de los Extractos Crudos Tóxicos (ECT).

A partir del sobrenadante se preparó la evaluación del extracto tóxico. Se sometió concentro las muestras en un baño de María durante una hora. Se evaluó el extracto tóxico con discos foliares de 6 diferentes genotipos de banano. Se sumergieron los 5 discos de 0.5 mm de diámetro de cada genotipo en las diferentes muestras de extracto tóxico de los aislados estudiados. Estas muestras se colocaron en una cámara oscura sometida a agitación durante 24 horas. Se midió a conductividad (ohms) del medio usando un conductímetro, y se registro los resultados en la tabla del experimento.

Materiales utilizados.

- Papel filtro waktman .05.
- Algodón esterilizado.
- Papel aluminio estéril.
- Gasa estéril cortada (10x10 cm).
- Tiras de medición de pH.
- Frascos de vidrio de 250 mL. de capacidad.
- Micropipetas de 100 y 50 microlitros.
- Puntas de pipetas de 100 y 50 microlitros.
- Espátulas.

- Tijeras.
- Mango de Bisturí 3 universal.
- Hoja de bisturí No. 4.
- Mechero Bunsen.
- Tubos plásticos cónicos de 50 mL (Falcon Becton and Dickinson, USA).
- Asas de platino.
- Gradillas.
- Alcohol industrial.
- Fundas de papel.
- Fundas plásticas.
- Hielera de espuma.
- 300 g de papas peladas.
- 30ml de jugo v8.
- 3½ litros de agua destilada y estéril.
- 2 litros de agua bidestilada Nanopure.
- 30.5 g Dextrosa.
- Balanza de precisión.
- 6 Erlenmeyer de 50ml.
- 3 cilindros graduados de 30ml.
- Placas de Petri.
- Perforadora.

- Grapadora.
- Gabinete de flujo laminar (Labcongo).
- Cámara de newbauer.
- Estereo microscópico (Leica).
- Zaranda orbital.
- Autoclave (esterilizador).
- Cuarto oscuro climatizado.

Metodología.

Toma de muestra.

Se tomo muestras foliares en sitios infectados con la enfermedad en tres zonas bananeras: Guayas, El Oro, y Los Ríos. Las muestras presentaban síntomas de la enfermedad, en estadios 5 y 6 (según la escala de Stover) y fueron transportadas al laboratorio en fundas de papel y Cajas Térmicas.

Una vez en el laboratorio las muestras fueron sometidas a incubación en fundas plásticas conteniendo algodón humedecido en agua destilada. La funda con la muestra fue inflada, con la finalidad de crear un ambiente semejante a una cámara húmeda que aumente la humedad relativa. Las fundas se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente a 26°C por espacio de 48 horas, con la finalidad de que el mayor número de pseudotecios se encuentren en estado maduro para su descarga.

Aislamientos monospóricos.

Después de las 48 horas de incubación se sacaron e identificaron las muestras y selecciono con ayuda de un estéreo microscopio los espacios de hojas que presentaban preferiblemente manchas necrosadas con halos blanquecinos, las cuales son identificadas como las de mayor esporulación. Estos sitios seleccionados se cortaron en pequeños cuadrados de 2 cm de las que fueron, con ayuda de grapas, colocados en trozos de papeles filtros cortados de tal manera que puedan ser colocados en cajas de Petri: en cada trozo de papel se colocaron de 5 a 6 pedazos de hojas. Hay que tener muy en cuenta

que los pedazos de hojas deben quedar grapados de tal manera que el envés de la hoja este libre para descargar los órganos sexuales de reproducción.

Terminada la selección y preparación de los materiales, los papeles filtros con pedazos de hojas se sumergieron en agua destilada por espacio de 5 minutos.

Luego de esta fase, el material humedecido se colocó en la tapa de una caja de Petri que contenga Agua - agar en un porcentaje de 3%. Después durante una hora, temperatura ambiente (25 °C), estos pedazos de hojas fueron dejados para que descarguen, luego los platos se voltean para la identificación de las áreas de descarga con un lápiz de cera e inmediatamente se procedió a retirar el papel con los trozos de hojas. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico y usando un aumento de 45X se identificaron los sitios de descarga y con aumento 100X se identificaron las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*.

En un gabinete de flujo laminar, cada caja de Petri se procesó, observó y localizó las ascosporas las mismas que se seleccionó por

su longitud aproximada de 18 a 19 μm , que corresponde al patógeno causante de la Sigatoka Negra (*M. fijiensis*).

Con la ayuda de un estereomicroscopio y de una asa fina se extrajo una ascospora y se la colocó en un medio de cultivo nutritivo, que permitirán un crecimiento vegetativo rápido y eficiente de una colonia monoascospórica.

Cultivos líquidos.

El medio líquido que se utilizó para el crecimiento del patógeno fue el PD-V8, que se preparó utilizando 200 gr. de papa por litro, 20 gr. de dextrosa y 16 ml de V8 filtrado por gasa estéril. El medio se esterilizó en un autoclave a 121°C por 15 minutos y se envasó en frascos de 250 ml, ocupando solo 50 ml de capacidad. Los medios envasados se taparon con algodón y papel filtro. El aditivo V8 se filtró con gasa esterilizada (0.22 μm) y se adicionó al medio de cultivo.

Inoculación de los medios líquidos.

De las colonias estudiadas, se liberó las esporas sumergiendo la colonia en agua destilada y esterilizada. La concentración de conidias fue contada usando una cámara de Neubauer. Se inoculó 3×10^3 esporas por cada recipiente. Esto se realizó en una cámara de flujo laminar, con pipetas automáticas para asegurar que los tratamientos recibieran una misma cantidad de inóculo. Una vez inoculadas se selló con un tapón de algodón y gasa, además de papel aluminio.

Las repeticiones de cada tratamiento, se colocaron aleatoriamente en una zaranda orbital a 140 r.p.m. La cual se encuentra ubicada en una cámara con temperatura de regulada a 28C y con luz regulada en periodos de 12 horas, con espacios similares de oscuridad.

Concentrados tóxicos.

Los cultivos líquidos inoculados se mantuvieron en la zaranda giratoria por el espacio establecido.. Se tomaron tres muestras por población analizadas, para cada día de evaluación. El sobrenadante se recolectó en un frasco Erlenmeyer de 50 ml y Coloco en baño de

María y para concentrarlo al 20% de su volumen inicial. El concentrado se utilizó para el ensayo de la conductividad eléctrica utilizando discos foliares.

Inoculación en discos foliares.

El material vegetal estudiado pertenecía al banco de germoplasma del laboratorio de biotecnología de la ESPOL. Ubicado en el Campus Prosperina, en el sitio denominado como la cañada de las musas. Se tomó tejido foliar de las plantas estudiadas en el ensayo respectivamente de la parte central de la hoja, en el tercio central entre el borde y el pecíolo. La muestra fue mantenida húmeda y en una hielera de espumaflón para evitar que se fenolize el tejido.

En el laboratorio las muestras se lavaron y se procedió a perforarlas de tal manera que todas tuvieron la misma forma al momento de efectuar el ensayo. Las muestras fueron colocadas en frascos de vidrio esterilizados y se las lavo con agua bidestilada.

Medición de crecimiento.

El micelio del hongo obtenido de los cultivos líquidos, fue se medio en los tiempos establecidos (5, 10, 15, 20,25) y se elaboró una curva de crecimiento. Se tomó las replicas del aislado individualmente y se separó por filtración el micelio del sobrenadante. El micelio se dejó escurrir en papel filtro por 30 minutos y luego se secó en una incubadora a 28 °C por 48 horas. Con el micelio seco se procedió a pesar y a tabular los datos obtenidos. Del sobrenadante separado, inmediatamente después que de retirar el micelio se midió el volumen final, pH, y azúcares presentes por refractometría, utilizando refractómetro manual de 0 a 32 grados Brix.

Medición de conductimetría.

Los extractos crudos tóxicos fueron incubados con 10 discos foliares de 0.5 cm de diámetro. Se efectuaron tres replicas por cada tratamiento y por cada material evaluado. Estos se incubaron juntos en una zaranda orbital a 140 r.p.m. por 24 horas, a 28 c°; aislado de la luz, en una cámara oscura. Se evaluó la liberación de electrolitos con un conductímetro, para pasar a poner las repeticiones en un autoclave

a 121 °C para poder medir la conductividad total. El conductímetro se limpio con agua bidestilada para cada medición que se efectúe.

3.2. Diseño experimental.

El ensayo en laboratorio tuvo un diseño completamente aleatorio, con tres replicas. Los resultados se analizaron con medidas de tendencia central y se asoció el crecimiento del patógeno con el resto de parámetros evaluados.

CAPITULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Curvas de crecimiento del hongo

La metodología de aislamiento de cultivos monospóricos es útil en el estudio de los diferentes aspectos involucrados en el establecimiento de la patogénesis de *M. fijiensis* y su hospedero Musa. La obtención de aislamientos monospóricos patogénicos, pueden ser mantenidos en un espacio relativamente pequeño, facilitando el establecimiento de ensayos en el laboratorio. La observación de las ascosporas y conidias bajo el microscopio nos asegura que lo que se siembra en los medios de cultivos sólidos son órganos de diseminación de *M. fijiensis*. Además el estudio morfológico de las colonias nos permiten asumir preliminarmente la

existencia de biotipos del hongo. Por lo tanto, la muestra y el correcto aislamiento del patógeno, es primordial para los ensayos posteriores.

Los cultivos líquidos permitieron investigar el desarrollo del patógeno; además, de su comportamiento del mismo. El crecimiento comienza a ser visible a los 2 días después de la inoculación. Todas las colonias presentaron, en esta fase inicial, una coloración blanco rosada. Se podía observar el desarrollo de los filamentos del hongo alrededor de un punto de crecimiento. Para el caso específico de los cultivos líquidos, el oscurecimiento del micelio ocurrió a los 3 días después de la inoculación. La colonia que presentó un oscurecimiento tardío fue la colonia de Guabo, a los 5 días de crecimiento. Los cultivos líquidos de *M. fijiensis* presentaron crecimiento en forma esférica durante el tiempo que se mantuvo en medio agitado.

El estudio de crecimiento en los distintos tratamientos se logró debido a que se inoculó una cantidad similar de esporas para cada uno de ellos, de tal forma que los tratamientos y sus réplicas tienen la misma concentración. Así los resultados pueden ser comparados para poder encontrar diferencias en su comportamiento.

Las curvas de crecimiento demuestran una estrecha relación entre el desarrollo del patógeno y el consumo de azúcares en medio de cultivo. Las variaciones de pH se mantienen homogéneas para los tres aislamientos estudiados. El comportamiento de la curva muestra claramente un periodo de adaptación seguido por un crecimiento acelerado. Pasando finalmente a una etapa en la que el crecimiento decrece. Se puede destacar que el máximo de crecimiento se alcanza a los quince días de crecimiento en cultivos líquidos agitados.

Estadísticamente no existieron diferencias significativas en las curvas de crecimiento. La curva de crecimiento nos muestra como el patógeno atraviesa por las diferentes etapas de desarrollo de los hongos filamentosos. Esto ocurre con una etapa inicial de adaptación, siguiendo otra exponencial y lineal, llegando al máximo de crecimiento a los 15 días en medios de cultivo líquidos, pasando finalmente a una etapa de autólisis del micelio. Las tres curvas de crecimiento alcanzan un máximo de crecimiento a los 15 días, pudiéndose observar que el aislamiento proveniente de Los Ríos (Quevedo) presentó el máximo en cuanto a masa de micelio se refiere.

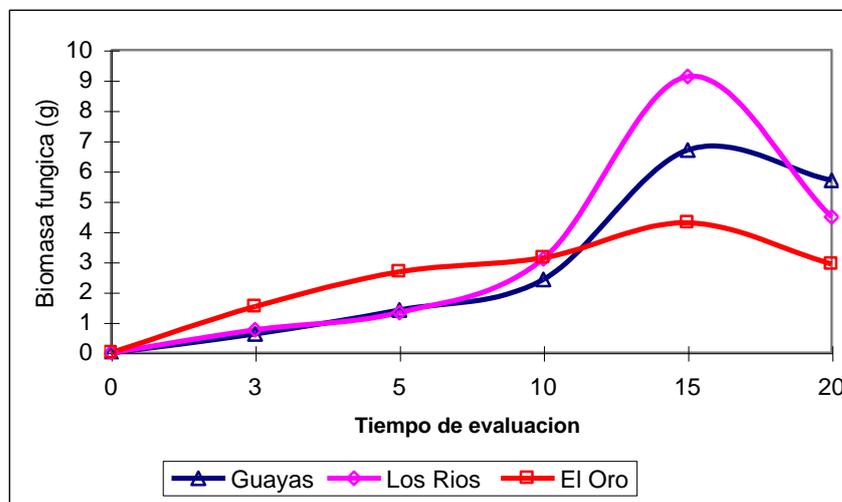


Fig.1 Curva de crecimiento de Tres Aislados Monospóricos de *Mycosphaerella fijiensis*.

Al medir el contenido de azúcares del medio de cultivo se puede observar que el micelio consume los azúcares del medio casi completamente a los 15 días, siendo de ahí en adelante totalmente descendente la curva por lo que la curva tiende a disminuir.

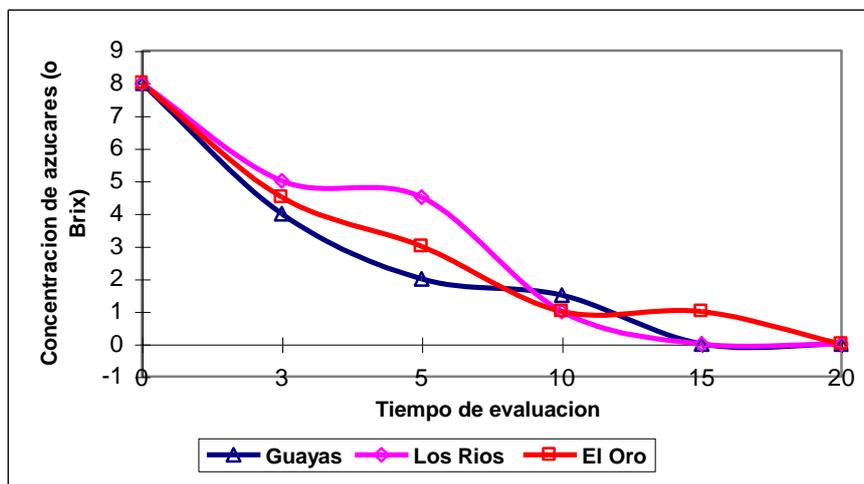


Fig. 2 Azúcares solubles en los medios líquidos procedentes de los aislamientos estudiados por refractometría.

Efecto del ECT en discos foliares.

Los datos analizados muestran que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las respuestas de mortalidad y de integridad celular, que pueda llevar a la conclusión de la existencia de diferencias entre los aislados utilizados. Además no se observan diferencias significativas en la respuesta de los diferentes genotipos de *Musa* frente a los aislados de **M. fijiensis**. Sin embargo se pudieron

observar diferencias significativas en la mortalidad e integridad celular obtenida, al enfrentar a los genotipos de musa con los extractos tóxicos obtenidos en diferentes tiempos. Esto se relaciona con las curvas de crecimiento de los tres aislamientos para los tiempos en que el hongo estuvo en su crecimiento máximo en las condiciones controladas.(Fig. 2)

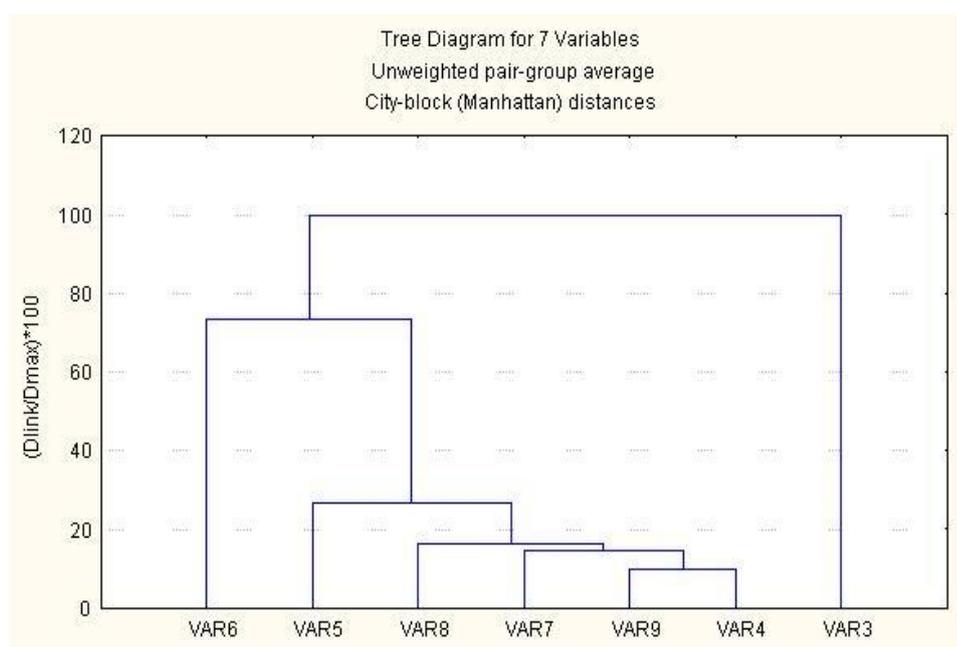


Fig. 3 Dendrograma de 7 variables (tiempo de crecimiento), utilizando el Modelo Manhattan city block.

Los tiempos correspondientes a los 15 y 20 días en los que se presentó mayor daño en la célula por la exposición a los extractos tóxicos corresponden a los tiempos en que el hongo presentó mayor crecimiento

de micelio. Los extractos tóxicos, por lo tanto, tienen un mayor efecto en los discos foliares cuando son obtenidos antes que la curva de crecimiento del patógeno inicie su etapa autolítica . (Fig. 1)

El daño producido al medir la mortalidad celular de los discos foliares frente a los concentrados obtenidos a los diferentes tiempos de crecimiento se grafica en las figuras 4, 5, 6, 7,8, y 9. En estas cada uno de los genotipos estudiados demuestra la evolución dinámica de la mortalidad celular en el tiempo. La variable 4 representa los 15 días de crecimiento en los cuales todos los genotipos mostraron un pico en el porcentaje de mortalidad.

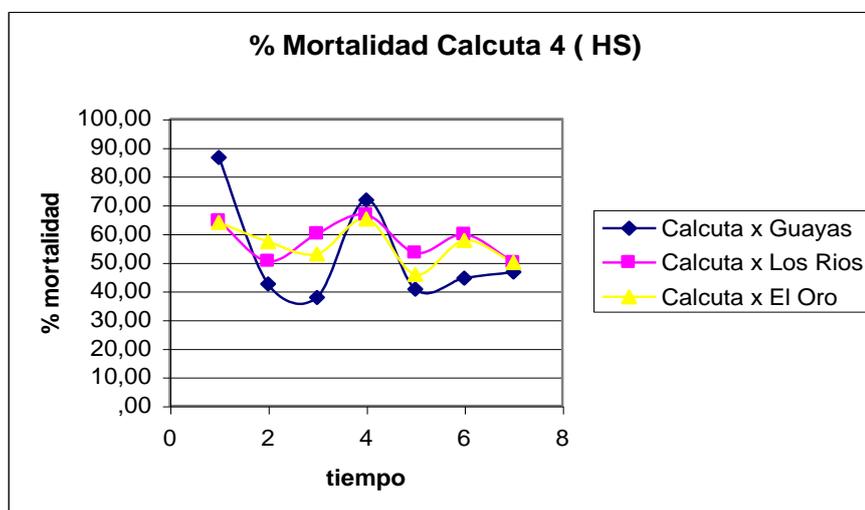


Fig. 4 Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de Calcuta 4 frente a diferentes aislados.

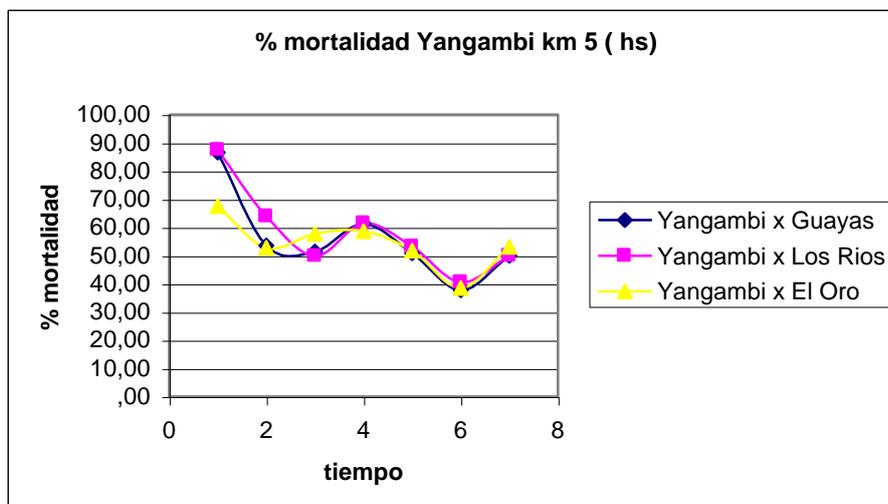


Fig. 5 Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de Yangambi Km. 5 frente a diferentes aislados

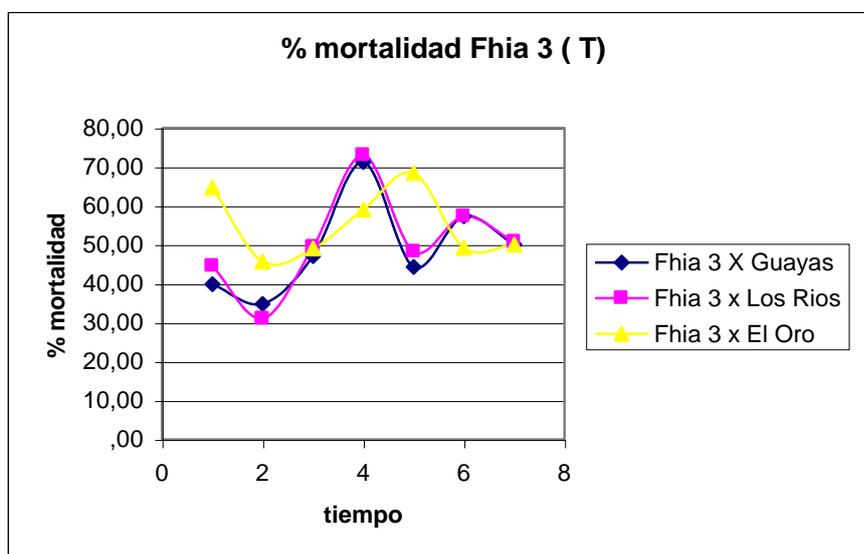


Fig. 6 Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de FHIA 3 frente a diferentes aislados.

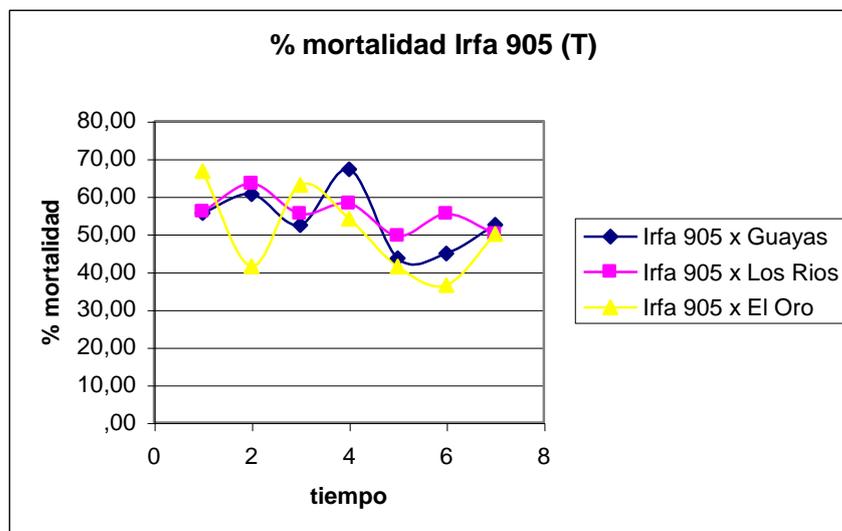


Fig. 7 Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de IRFA 905 frente a diferentes aislados.

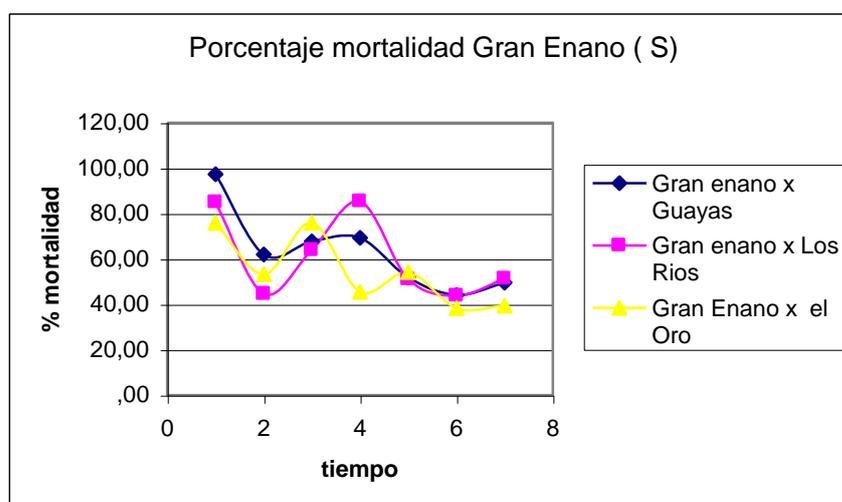


Fig. 8 Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de Gran Enano frente a diferentes aislados

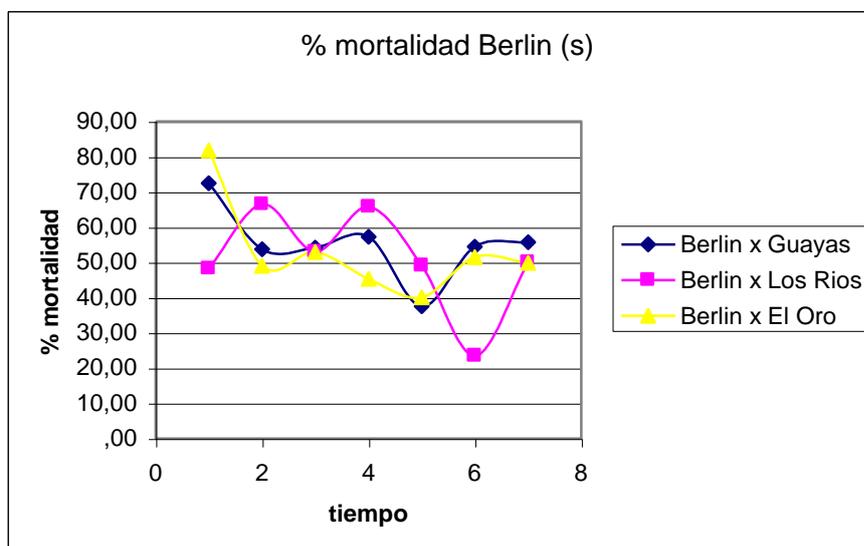


Fig. 9 Curvas de las mortalidades celulares de discos foliares de Pisang Berlín frente a diferentes aislados.

Estadísticamente los análisis efectuados mediante el uso del programa estadístico del SPSS muestran que no existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar los resultados de Mortalidad vs. Genotipo, Mortalidad vs. Aislado, de igual forma con la integridad. Diferencias significativas al diferenciar el daño ocasionado por el extracto tóxico en el tiempo. Es decir que se diferencian los resultados obtenidos en los tiempos observados asociados estos con los puntos de mayor desarrollo en la curva de crecimiento del patógeno.

Discusión.

Es poca la información disponible sobre el comportamiento y la interrelación del patógeno en campo y en condiciones controladas lo cual es confirmado por Ghaul en su estudio epidemiológico de la Sigatoka Negra. Varias han sido las personas que acuden al cultivo líquido como forma segura de obtener micelio de hongos patógenos para sus estudios de caracterización. Johanson en sus estudios moleculares obtuvo el mayor desarrollo entre los días 15 y 20 en cultivos líquidos de aislamientos de *M. fijiensis* provenientes de otros puntos geográficos.

Aunque no se presentan estudios sobre curvas de crecimiento del patógeno en la literatura citada, si mantiene el ritmo de crecimiento de los hongos filamentosos, identificándose las diferentes fases de desarrollo. Harlenmania identificó dentro de sus cepas estudiadas, la presencia de algunas de las más virulentas. En nuestro caso los tres aislamientos estudiados (Boliche, Quevedo, Guabo) presentaron diferencias en sus curvas de crecimiento.

Las variantes climáticas afectan al desarrollo de la enfermedad, además de su reproducción, como lo reportan Ghaul, Sandoval y Romero. Los complejos climáticos en los países estudiados influyen en la reproducción y desarrollo. Por esta razón se habla de un complejo planta-enfermedad-clima, que debe estudiarse en todas sus variantes incluyendo la posibilidad de que aparezcan tipos patogénicos dentro de la población de patógeno en el país.

Las toxinas de *M. fijiensis* demuestran ser un factor secundario de resistencia, que puede ayudar en programa de mejoramiento en la búsqueda de genotipos resistentes. Pérez, Cordeiro, y Martínez destacan en sus informes la importancia de poder encontrar genotipos resistentes que ayuden en un combate mucho más sustentable de la Sigatoka negra. Upadyah reconoce la actividad específica de los compuestos estudiados de los extractos crudos, pero insisten en que no se puede diferenciar entre materiales germoplásmicos, aun así se reconoce a estos extractos como una herramienta viable especialmente si se trabaja con formas de tejido diferente como los callos embriogénicos en busca de resistencia.

Mediciones de conductimetría efectuados por Harlenmania identificaron actividad biológica del extracto crudo al igual que con los aislados

estudiados en nuestro ensayo, comprobando los estudios de la actividad tóxica de los extractos tóxicos. Estos extractos al igual que los obtenidos de esporas de Riveros y Strobel lograron reproducir lesiones, lo cual comprueba su actividad biológica medida por liberación de electrolitos en el trabajo efectuado por Harlenmania.

CAPITULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones.

La relación planta – patógeno esta dada por un amplio espectro de variantes. La respuesta frente a un hongo patógeno esta dada por la combinación o ausencia de mecanismos de defensa presentes en la planta. Además, debido a que el patógeno posee un ciclo de vida más corto que el de la planta, también tiene la posibilidad de adaptarse mas rápidamente, pudiendo, en un periodo de tiempo y bajo variantes de presión como el uso de productos químicos, encontraste tipos más agresivos. De ahí la razón de que, un programa de mejoramiento que

busca la resistencia a una enfermedad, requiere de la consideración de varios aspectos de la relación planta patógeno existente. Sobre la base de los resultados proponemos a consideración algunas conclusiones y recomendaciones que nos permitirán continuar en futuros trabajos:

1. Los cultivos monospóricos demostraron ser la forma más segura de estudiar *M. fijiensis*, ya que su proceso de aislamiento asegura la eliminación de otros contaminantes. Facilita el almacenamiento de los diferentes aislados en un área pequeña y permitió ensayar al mismo tiempo con más de una población de patógeno.
2. El estudio de la curva de crecimiento es una herramienta que ayuda a la caracterización de diferentes aislados patogénicos y provee fácilmente material necesario para el estudio del micelio y las toxinas.
3. Los extractos crudos tóxicos pueden ser utilizados como determinantes secundarios en un programa de mejoramiento genético.

4. La medición de la mortalidad celular mediante la conductimetría en discos foliares de banano es un método fácil y masivo para el estudios de los metabolitos tóxicos en *Mycosphaerella fijiensis*.
5. Al caracterizar a los materiales frente a un rango amplio de aislados del patógeno se asegura que la planta mejorada está en capacidad de mantener su respuesta en un área más amplia.
6. El punto de máximo desarrollo y daño a los discos foliares fue a los 15 y 20 días . Esta observación sé presentó en los tres aislados estudiados y se concluye que es parte de la conducta y dinámica de crecimiento de *M fijiensis*.
7. Estadísticamente se observa diferencias significativas en los tiempos estudiados.
8. El dendograma demuestra como la mortalidad obtenida con el extracto crudo toxico en el tiempo 15 días de crecimiento de micelio posee una mortalidad celular que la diferencia de los

demás tiempos de crecimiento. Lo cual concuerda con el máximo de crecimiento del micelio en medios líquidos.

Aun así estos resultados deben ser comparados con la respuesta del material frente al patógeno en condiciones controladas o inoculaciones dirigidas que corroboren que el material posee una respuesta deseable desde el punto de vista del mejorador, y que además, posee una respuesta estable frente a los diversos aislamientos de una población del patógeno. Los métodos de purificación del extracto tóxico se pueden mejorar mediante la incorporación de un proceso de rotaevaporación para la obtención del extracto tóxico concentrado de manera más rápida y utilizando solventes orgánicos.

Recomendaciones.

1. Se recomienda avanzar en la investigación de las curvas de crecimiento de diferentes aislados patogénicos que se encuentran en la colección del laboratorio de fitopatología del CIBE, a fin de poder encontrar posibles aislamientos con curvas que describan una conducta diferenciada de la media nacional. Además estos estudios pueden correlacionarse a la dinámica de producción de extractos tóxicos en los que se pueda corroborar que el mayor

crecimiento alcanzado se relaciona con la mayor mortalidad celular en hojas de genotipos de Musa.

2. Se debe avanzar en la purificación de los extractos tóxicos, en busca de fracciones tóxicas que ayuden en el pesquisaje de hojas de banano en un programa de mejoramiento genético así como relacionar los resultados con los obtenidos de ensayos de campo.

3. Se recomienda que se continúen los estudios del patógeno y se mantenga la colección de cultivos monospóricos del patógeno en el laboratorio de fitopatología del CIBE. Además se deben mantener cultivos líquidos agitados de ***M. fijiensis*** que suministre micelio necesario para estudios moleculares del microorganismo buscando una de las vías para comprender la interrelación ***Mycosphaerella fijiensis*** y ***Musa***.

BIBLIOGRAFIA

1. Cordeiro, Zilton 1998. La Sigatoka negra en Brasil. Infomusa Vol 7, No 1, Pág. 30-31.
2. Chang, J.F 2000. Efectos de la Dolarización en el costo de Producción del Banano en el Ecuador. Acorbat 2000.
3. Espinoza, Alfonso. 1998. Estudios epidemiológicos de la Sigatoka negra en Ecuador. Acorbat 98.
4. Fouré, E. 1994. Leaf spot diseases of Banana and Plantain caused by *Mycosphaerella Musicola* and *M.fijiensis*. Inibab Annual report: 37-45.
5. García, L. 1996. Metodología para la selección de plantas in vitro para la resistencia a Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, en banano. Infomusa, Vol 6, No 1, Pag 14 – 15.

6. Gauhl, Friedhelm 1994. Epidemiología y Ecología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, MORELET) en plátano (*MUSA* spp.), en Costa Rica. Editado por INIBAP. 120 pp.
7. Harlenmania, G. 1997. Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to black leaf streak. *Euphytica* 96: 125-128.
8. Hecheverry, E. 1997." Evaluación de híbridos, clones de platano, y banano en el centro sur del departamento de Tolima, Colombia." *Infomusa* Vol 7, No 2, Pág. 14 – 16.
9. Jones, D.R. 1999. **Diseases of Banana, Abacá, and Enset**. CABI publishing, CAB international.
10. Knogge, Wolfgang. 1996. Molecular basis of specificity in host/fungus interactions. *European journal of Plant Pathology* 102; 807-816.
11. Martínez, Gustavo. 1996. Situación actual de la Sigatoka negra en Venezuela. *Infomusa* Vol 6, No 1, Pag 16-17.

12. Martínez, Gustavo 1988. Sigatoka negra en Venezuela, informe 1997. Infomusa Vol. 7, No 1, Pág. 31-32.
13. Marín, Douglas 1991. El sistema de previos Biológico Para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano experimental. CORBANA informe anual 1990.
14. Marín Douglas *et..al.* 1992. Efecto de la Sigatoka negra sobre la productividad del plátano. CORBANA, informe anual 1991.
15. Pérez, Luis 1996. Manual para el manejo integrado de Sigatoka negra y Sigatoka amarilla en banano y plátano. Proyecto TCP/CUB/4454. 27pp.
16. Pérez, Luis 1998. Control de Sigatoka negra en Cuba: Un enfoque de manejo integrado de la enfermedad. Infomusa Vol 7, No 1, Pág. 26-30.

17. Romero, R. 1990. Estrategias para el combate de la Sigatoka negra (**Mycosphaerella fijiensis** MORELET) y el impacto sobre la resistencia a los bezimidazoles. ACORBAT 1991.
18. Robinson, J.C. 1999. **Banana and Plantains**. CABI publishing, CAB international.
19. Rowe, Phillip. 1985. Fitomejoramiento de bananos y Plántanos. UPEB, 19 pp.
20. Riveros, Alba. 1996. Estudio de inductores asociados a la resistencia del cultivar Yangambi Km. 5 a *Mycosphaerella fijiensis*. Infomusa Vol. 6, No 1, Pág. 33.
21. Ramírez, Gerardo. 1991 Epidemiología de la Sigatoka negra en la región de la sierra de tabasco, México. Acorbat 1991, Pág. 87.
22. Stierle, A.A. 1991. The Phytotoxins of **Mycosphaerella fijiensis**, the causative agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia* 47.

23. Stobel, G.A .1992. The Phytotoxins of **Mycosphaerella fijiensis**, the causative agent of Black Sigatoka Disease, and their potential use in the Screening for disease resistance. Biotechnology application for Banana and Plantain Improvement. INIB.
24. Upadhyay, R.K. 1995. Fijiensis, the first Phytotoxin from **Mycosphaerella fijiensis**. The causative agent of black Sigatoka disease.
25. Walton, J.D. 1996. Host selective toxins: Agents of compatibility. The plant cell, Vol. 8, 1723-1733.