ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

*Efecto de los Biofertilizantes Líquidos de Producción Local "Bioles", sobre el Desarrollo de Síntomas Causados por el Virus del Mosaico de la Calabaza (SqMV) en el Cultivo de Melón (**Cucumis melo** L.) var. Edisto en Condiciones de Invernadero.*

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÍCOLA Y BIOLÓGICO

Presentada por:

Robert Alexander Álvarez Quinto

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2011

AGRADECIMIENTO

A mis padres, por motivarme constantemente y les agradezco su apoyo y haberme permitido estudiar en esta prestigiosa institución.

Al personal del CIBE, en especial a la Dra. Esther Lilia Peralta directora del centro por su importante contribución en la realización de este trabajo y a mi directora de tesis la Ing. Lisbeth Espinoza por su apoyo, orientación y sobre todo por la paciencia brindada durante el transcurso de este trabajo.

De manera especial a mis amigos y compañeros del CIBE, Ing. Jorge Paredes, Srta. Alejandra Ibarra, Ing. María Jama, Ing. Freddy Magdama, Ing. Omar Ruiz, Don Rufino Meza, por su colaboración en este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, la Sra. Mariela Quinto y el Agr. Robert Álvarez por su apoyo incondicional y su amor desinteresado.

A mis hermanos Bryan, Ariana, Ronny.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Marcelo Espinosa L.

DECANO DE LA FIMCP

PRESIDENTE

Ing. Lisbeth Espinoza Lozano

DIRECTOR DE TESIS

Efrén Santos O. Ph.D.

VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

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

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

Robert Alexander Álvarez Quinto

RESUMEN

Los bioles son un tipo de biofertilizante líquido (obtenidos anaeróbicamente), ricos en micronutrientes, fitohormonas y microorganismos benéficos. Se utilizan como abono, estimuladores del crecimiento vegetal e inductores de respuestas fisiológicas como floración y fructificación; recientemente se ha comprobado su efecto como inhibidor del crecimiento de hongos fitopatógenos. Esta investigación consistió en realizar un estudio inicial acerca del efecto de los biofertilizantes líquidos de producción local "Bioles", sobre el crecimiento de plantas y la severidad de síntomas observados en plantas de melón (***Cucumis melo*** L.) infectadas por el virus del mosaico de la calabaza (SqMV). Fueron evaluadas cuatro dosis de bioles (5, 10, 15, 25%, v:v) aplicados semanalmente vía foliar. La aplicación foliar de biol en dosis del 25% en plantas infectadas, ocasionó un incremento significativo en la longitud (22%) y número de hojas, así como una reducción (26%) en la severidad de síntomas producidos por SqMV. El análisis de correlación evidenció que las dosis de los bioles mantienen una alta correlación positiva con la longitud de las plantas y el número de hoja, contrario a lo que sucede con la severidad de los síntomas producidos por SqMV que se ven reducidos a medida que se incrementan las concentraciones de bioles. Los resultados sugieren un efecto positivo del biol sobre las plantas de melón infectadas por SqMV, no registrados con anterioridad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN I

ÍNDICE GENERAL II

ABREVIATURAS V

SIMBOLOGÍA VI

ÍNDICE DE FIGURAS VII

ÍNDICE DE TABLAS VIII

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO 1

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4

1.1. Enfermedades virales que afectan las cucurbitáceas. 4

1.1.1. Virus del mosaico de la calabaza (SqMV). 6

1.1.2. Virus del mosaico del pepino (CMV). 8

1.1.3. Virus del Mosaico de la Sandía tipo 2 (WMV-2). 10

1.1.4. Virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV). 11

1.1.5. Virus de la mancha anular de la papaya tipo W(PRSV- W). 13

1.2. Biofertilizantes Líquidos "Bioles". 15

1.2.1. Composición. 15

1.2.2. Métodos y proceso de Elaboración.. 18

1.2.3. Principales usos de los Bioles. 19

1.2.4. Efecto de los bioles sobre enfermedades. 21

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y METODOS. 24

2.1. Recolección e identificación de aislamientos virales. 24

2.2. Conservación *in vivo* de aislamientos virales. 25

2.3. Evaluación del efecto de bioles en condiciones de invernadero. 26

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 33

3.1. Identificación y mantenimiento de aislamientos virales. 33

3.2. Evaluación del efecto de los bioles bajo condiciones de invernadero. . 35

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 51

4.1. Conclusiones. 51

4.2. Recomendaciones. 52

BIBLIOGRAFÍA. 53

APÉNDICES 63

ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
ddi	Días después de inoculación
dds	Días después de la siembra
ddt	Días después del trasplante
FAO	Food and Agriculture Organization
HR	Humedad Relativa
pH	Potencial de Hidrógeno

SIMBOLOGÍA

cm	Centímetros
^{O}C	Grados centígrados
L	Litro
'	Minutos
nm	nanómetro
"	Segundos

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 3.1	Inoculación mecánica de SqMV, síntomas observados..……...	35
Figura 3.2	Efecto de la aplicación foliar de biol el promedio de longitud de las plantas, 42 ddi……..	37
Figura 3.3	Efecto de la aplicación foliar de biol sobre el número de hojas por planta, 42 ddi……	39
Figura 3.4	Efecto de la aplicación foliar de biol sobre el índice de severidad, 42 ddi…….	40
Figura 3.5	Intensidad de síntomas observados en plantas de melón infectadas con SqMV y tratadas con distintas dosis de biol, 42 ddi……..	42
Figura 3.6	Progreso de la severidad en el tiempo para cada tratamiento…….	44

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Descripción de los tratamientos evaluados……..	26
Tabla 2	Composición de las soluciones nutritivas utilizadas..……...	27
Tabla 3	Escala de evaluación de síntomas…….	29
Tabla 4	Resultados de la detección imnunoenzimática de SqMV……..	33
Tabla 5	Valores de severidad observados con mayor frecuencia (Moda) por tratamiento……	45
Tabla 6	Análisis de correlación de las variables……	47

INTRODUCCIÓN

En el ámbito internacional las enfermedades virales han causado importantes pérdidas económicas en cultivos comerciales, aunque no han podido ser exactamente cuantificadas (4), (8), (58), (59). En nuestro país se estimaron pérdidas superiores a ocho millones de dólares en el año 2007, debido a que alrededor de 3000 Ha de cultivos hortícolas fueron devastadas por virosis en una de las mayores zonas productoras de hortalizas (5).

En la actualidad no existen medidas correctivas para el control de enfermedades virales de las plantas, por lo que las medidas de manejo están orientadas a reducir las fuentes de infección y limitar la trasmisión por vectores (3), (59).

El virus del mosaico de la calabaza (SqMV) es una enfermedad viral de tipo emergente, que en los últimos años ha afectado los cultivos de cucurbitáceas en el Ecuador; fue recientemente informado en nuestro país por Espinoza et al (13) en cultivos de melón en la provincia del Guayas. El método más común utilizado por los agricultores para minimizar su efecto, consiste en limitar la transmisión vectorial mediante la aplicación de insecticidas de las

familias organofosforados, carbamatos y piretroides, causando efectos negativos sobre su salud y el medioambiente (60), (6).

Los biofertilizantes líquidos de producción local “Bioles”, son obtenidos mediante un proceso de fermentación anaeróbica, utilizando como materia prima principal estiércol vacuno, microorganismos de la rizósfera, bacterias acido lácticas, entre otros compuestos minerales (40). Aunque la composición de los bioles puede ser muy variable, dificultando la reproducibilidad de resultados favorables obtenidos, las investigaciones realizas por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), han logrado estandarizar el proceso de elaboración de los mismos y establecido parámetros de calidad mediante los cuales se asegura la composición final de los bioles de producción local (54), (55).

A pesar de que el efecto positivo de los bioles en el crecimiento y en el incremento de producción de los cultivos, ha sido ampliamente estudiado (27), (29), (35-40), así como su actividad fungicida o fungistática contra patógenos como: ***Moniliophthora roreri*** (57), ***Mycosphaerella fijiensis*** (35) y recientemente ***Fusarium oxyporum y F. solani*** (53), hasta el momento no existen registros de investigaciones, relacionadas al uso de los bioles con la finalidad de promover el crecimiento o reducir la severidad de los síntomas en plantas enfermas con virus.

Con estos antecedentes, se plantea el objetivo principal de esta investigación, que consistió en evaluar bajo condiciones de invernadero el efecto de los biofertilizantes líquidos de producción local, en el crecimiento y severidad de los síntomas en plantas de melón (***Cucumis melo*** L.) infectadas por SqMV. ¨Para cumplir con el objetivo general fueron planteados los siguientes objetivos específicos: 1) Identificar y mantener la fuente de inóculo viral de SqMV. 2) Evaluar el efecto de distintas concentraciones de biol de producción local sobre plantas inoculadas con SqMV en condiciones de invernadero.

CAPÍTULO 1

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Enfermedades virales que afectan las cucurbitáceas.

De acuerdo con las estadísticas de FAO, alrededor de 149 millones de toneladas métricas de cucurbitáceas son producidas a nivel mundial, siendo China el principal productor; en nuestro país las cucurbitáceas no figuran como un rubro que genere divisas por exportación; sin embargo resultan de gran interés económico local, sirviendo de sustento para los pequeños agricultores y cubriendo la demanda interna de alimentos (1).

Los virus fitopatógenos son económicamente importantes, por ser causantes de enfermedades y pérdidas de productividad en los cultivos; todas las especies de plantas cultivadas por el hombre son afectadas por al menos un virus (2), (3).

Las enfermedades virales en los cultivos de cucurbitáceas son bastante frecuentes: se registran al menos 37 virus distintos que afectan las principales cucurbitáceas producidas en el mundo. Cada uno de estos virus puede presentarse en infecciones naturales y puede ser capaz de infectar a más de un hospedero (4). En Ecuador se estima que en el año

2007 unas 3000 Ha de cultivos hortícolas como tomate (***Solanum lycopersicum*** L.), melón (***Cucumis melo*** L.), sandía (***Citrullus lanatus*** (Thunb) Matsum. & Nakai), fueron afectadas por un problema no identificado de virosis en la provincia de Manabí, una de las mayores zonas productoras de hortalizas del país, causando pérdidas superiores a los ocho millones de dólares (5).

Las enfermedades virales afectan a las plantas de manera indirecta, interfiriendo en el metabolismo de las plantas infectadas causando: reducción de la capacidad fotosintética de la planta, disminución de sustancias reguladoras de crecimiento (Fitohormonas) y el incremento de sustancias inhibidoras del crecimiento, incremento la respiración celular. Lo que ocasiona plantas cloróticas, de crecimiento reducido con frutos deformes y baja de productividad (3-6).

Los síntomas más comunes de virosis en las cucurbitáceas son mosaicos, amarillamientos, reducción de tamaño, rugosidad, rizados y deformaciones en la hojas. También necrosis, mosaicos y deformaciones en los frutos (6).

Entre las enfermedades más comunes y perjudiciales para los cultivos de cucurbitáceas están (6-8):

Virus del mosaico de la calabaza (SqMV*, Comoviridae*), Virus del mosaico del calabacín (ZYMV*, Potyviridae*), Virus del mosaico del pepino (CMV*, Bromoviridae*), Virus del mosaico de la sandía (WMV-2, *Potyviridae*), Virus de la mancha anular de la papaya raza sandía (PRSV- W, *Potyviridae*) (6-8):

1.1.1. Virus del mosaico de la calabaza (SqMV).

El virus del mosaico de la calabaza (SqMV) pertenece al género *Comovirus*; es un virus de partículas isométricas circulares de 30 nm de diámetro y un genoma dividido, compuesto por dos moléculas de ARN de cadena sencilla (9), (10); se encuentra distribuido mundialmente (8), (11). Probablemente el primer reporte de esta enfermedad se realizó en 1934 en California (12); en Ecuador fue reportado por primera vez en el 2009 por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador en plantaciones de melón (13).

SqMV es capaz de infectar al menos cuatro familias botánicas diferentes (14), y un total de quince especies distribuidas en 11 géneros botánicos de plantas. Las cucurbitáceas son su huésped natural (9), (10).

La transmisión del este virus puede ocurrir mecánicamente, a través de insectos vectores y por semillas. La transmisión mecánica ocurre por el contacto entre plantas sanas y enfermas; de la misma manera por la contaminación de las herramientas de trabajo (6), (14). A través de semillas ocurre en tasas de transmisión de 0.14 -10%; se presume que este mecanismo de transmisión sea el responsable de su dispersión mundial (8), (10).

Los insectos vectores son uno de los principales mecanismos de transmisión; SqMV presenta características de “no persistencia” y los principales vectores son: el escarabajo rayado occidental del pepino (***Acalymmatri vittatum*** Mannerheim), el escarabajo manchado del pepino *(**Diabrotica undecimpunctata*** howardi Barber), y la “vacanita” del melón (***Epilechna chryssomelina***) el primer coccinélido vector (10). Se presume también la transmisión por el pulgón del melón (***Aphis gossypi***) en tasas de transmisión del 10.84 % (16).

El virus del mosaico de la calabaza en el cultivo de melón (***Cucumis melo*** L.) causa mosaicos, amarillamientos sistémicos, aclaramiento de nervaduras, distorsiones foliares haciendo que las nervaduras se extiendan más allá del margen foliar y en algunas

variedades de melón los frutos pueden desarrollar mosaicos muy severos. En calabazas (***Cucurbita pepo)*** produce amarillamientos, aclaramiento de las nervaduras, moteados, distorsiones severas, hiponastias, protuberancias en las hojas y reducción del área foliar (17).

En plantas de pepino (***Cucumis sativus*** L.) las hojas jóvenes pueden desarrollar hiponastias y manchas amarillentas, que pueden llevar a fuertes amarillamientos de las nervaduras (17).

1.1.2. Virus del mosaico del pepino (CMV).

El virus del mosaico del pepino (CMV), perteneciente al género *Cucumovirus* de la familia *Bromoviridae,* es el virus con mayor rango de hospederos conocidos, superando las 1300 especies, en más de 500 géneros que superan las 100 familias de plantas; anualmente se producen nuevos reportes de hospederos (3), (19).

Es un virus de partículas isométricas de 28-30 nm de diámetro y fue descrito primera vez como una enfermedad de las cucurbitáceas en 1916 por Doolittle Jagger en New York (18).

Los síntomas causados por CMV en cucurbitáceas son: retraso en el crecimiento, mosaicos severos, reducción del tamaño y distorsión de hojas y frutos, rugosidad de la superficie de frutos, manchas verdes en calabazas amarillas y mosaicos en los frutos (4), (9).

A pesar de esto, la mayoría de síntomas como mosaicos, clorosis y filimorfismo foliares producidos por CMV son inespecíficos y pueden ser provocados por otros virus en la misma especie vegetal (18).

La transmisión por vectores se realiza por más de 80 especies de áfidos (en 33 géneros) de manera no persistente; los dos vectores más estudiados y de mayor eficiencia en su transmisión son: ***Aphis gossypii*** y ***Myzus persicae***. A través de semillas la eficiencia de transmisión es variable y ha sido cuantificada entre 1-50 % (18).

CMV es una de las enfermedades más comunes de las cucurbitáceas y causa pérdidas económicas severas en cultivos de melón, pepino y zapallo, pero raramente en sandias (9).

1.1.3. Virus del Mosaico de la Sandía tipo 2 (WMV-2).

El virus del mosaico de la sandía (WMV) es un potyvirus, conformado por partículas virales con la forma de bastoncillos flexuosos de unos 760 nm de longitud, que contienen una cadena simple de ARN (6). Tiene un amplio rango de hospederos y es capaz de infectar a la mayor parte de miembros de las cucurbitáceas y muchas especies leguminosas; de manera experimental se conoce puede infectar al menos 16 familias de plantas, más de 160 especies vegetales (6), (19).

Inicialmente fue dividido en dos grupos WMV1 y WMV2, los cuales posteriormente se clasificaron como entidades distintas y se demostró que WMV está muy relacionado con el virus de la mancha anular del papaya (PRSV)(Purcifull and Hiebert 1979). En la actualidad, WMV1 es considerado como la cepa “W” del virus de la mancha anular del papaya (PRSV), mientras que WMV2 es un sinónimo para el virus del mosaico de la sandía (WMV) (21).

Los síntomas varían ampliamente dependiendo de la especie, variedad, cepa viral y las condiciones medioambientales (6), (19).

La sintomatología observada incluye mosaicos, rugosidad de las hojas, bandeado de nervaduras, anillos cloróticos y deformaciones. En los frutos no se observan deformaciones, aunque cierta parte de su coloración es afectada adversamente por manchas verdes, particularmente en frutos amarillos (6).

Algunos cultivares de ***Cucurbita pepo*** L. y ***Cucumis melo*** L. responden con síntomas foliares muy graves, similares a los producidos por el virus tipo "W" de la mancha anular de la papaya y el virus del mosaico amarillo del calabacín (6). En algunas especies no causa síntomas, y en la sandía generalmente son poco visibles (19).

1.1.4. Virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV).

El virus mosaico amarillo del calabacín, consiste en partículas flexuosas filamentosas de 750 nm de largo, conformada por una cadena sencilla de ARN y alrededor de 9600 nucleótidos (22). Fue aislado por primera vez en Italia en 1973 a partir de una planta de calabacín (***Cucurbita pepo*** L.), y descrito en 1981 por Lisa *et. al.* (23). Posteriormente fue detectado en todos los continentes en

solo una década. En la actualidad es uno de los virus de mayor importancia económica de los cultivos de cucurbitáceas (21), (22).

ZYMV causa síntomas extremadamente severos, que pueden llevar a la pérdida completa de la producción en caso de contaminación temprana. Su principal característica es la severidad de sus síntomas (21). El número de hospederos es moderado y puede infectar 10 familias vegetales, pero principalmente infecta las cucurbitáceas (14).

Los síntomas ocasionados en melón (***Cucumis melo*** L.) pueden ser aclaramiento de las nervaduras, mosaicos amarillos y deformación foliar; ocasionalmente se presentan ampollas y enaciones foliares, seguidas frecuentemente por retraso de crecimiento. En los frutos se puede observar diversos síntomas, como mosaicos externos, grietas necróticas, marmoleo interno y endurecimiento de la pulpa. Las semillas pueden deformarse severamente y presentan bajas tasas de germinación (21), (22).

En calabacín zuchinni, los síntomas son muy severos en hojas y frutos; los frutos desarrollan prominentes protuberancias que afectan su calidad. En la sandía (***Citrullus lanatus*** (Thunb)

Matsum & Nakai) se observa filimorfismos foliares, moteados; irregularidad en la coloración de los frutos y desde ligeras hasta graves deformaciones (21), (22).

En otros tipos de calabaza (***Cucurbita pepo***, ***C. moschata***, ***C. maxima***) los síntomas pueden variar desde moteados hasta severos mosaicos que ocasionalmente se recuperan. Los frutos también pueden presentar distorsiones (22).

1.1.5. Virus de la mancha anular de la papaya tipo W (PRSV- W).

El virus de la mancha anular de la papaya, es miembro de la familia *Potyviridae*, una de las más grandes y posiblemente el grupo de mayor importancia económica de virus fitopatógenos (Gonsalves, Suzuki, and Tripathi 2009). Las partículas virales son bastoncillos de 760-780 nm x 12 nm con un solo ARN de simple cadena, de unas 10326 bases (24).

Según sus hospederos las cepas de PRSV han sido diferenciadas de la siguiente manera: PRSV-P tipo papaya es capaz de infectar a la papaya y cucurbitáceas; PRSV-W tipo sandía infecta a las cucurbitáceas; pero no a la papaya (9).

Los hospederos de PRSV-W están limitados a las cucurbitáceas, siendo capaz de infectar a 40 especies en 11 géneros de plantas, y se encuentra distribuido mundialmente (6). El patotipo PRSV-P es serológicamente idéntico al patotipo PRSV-W (7).

Los síntomas provocados por este virus en las especies cucurbitáceas más susceptibles son afecciones foliares y raquitismo severos. Es frecuente observar en el follaje de las plantas infectadas mosaicos verdes, deformaciones, arrugas, ampollas, distorsiones y estrechamiento de las láminas foliares (6), (9). Un síntoma frecuente es la reducción severa de las hojas apicales que muchas veces se reducen a los principales nervios. Los frutos de las plantas infectadas son a menudo severamente afectados con deformaciones y cambios de color (6).

La propagación por vectores se realiza eficientemente, de manera no persistente por más de 20 especies de áfidos, especialmente ***Aphis craccivora*** Koch, ***A. gossypii*** Glover, ***A. spiraecola*** Patch, ***Aulacorthum solani*** Kaltenbach, ***Macrosiphum euforbiae*** Thomas y ***Myzus persicae*** Sulzer. Puede transmitirse con gran facilidad mecánicamente y no existen evidencias de transmisión por semillas (6).

1.2. Biofertilizantes Líquidos "Bioles".

Los bioles son biofertilizantes líquidos obtenidos al final de un proceso de biodigestión anaeróbica de materiales orgánicos (25), (26); corresponden a la fracción liquida, rica en nutrientes y hormonas vegetales con numerosos efectos positivos en los cultivos cuando son aplicados al follaje de las plantas o al suelo (25), (27), (28).

Generalmente los bioles son utilizados con el propósito de mejorar la nutrición de los cultivos y también como estimuladores del crecimiento, floración y fructificación de los cultivos con resultados favorables (29-35). Inicialmente los biodigestores fueron desarrollados con la finalidad de obtener biogás, pero en nuestro país se los está utilizando principalmente para obtener biofertilizantes “bioles” con excelentes resultados (26)

1.2.1. Composición.

Los bioles son fuentes de macro y micronutrientes, fitohormonas reguladoras de crecimiento e importantes microorganismos benéficos (27), (36).

Las principales características químicas son pH 5 – 8, bajo porcentaje de materia seca (1-6 %), presencia de elementos como

nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, azufre que varían ligeramente según los materiales usados en su elaboración. En su composición es posible encontrar moléculas reguladoras de procesos fisiológicos como ácido indolacético, giberelinas, tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido nicotíco y purinas, entre otras (27), (28).

Además, los bioles son ricos en microorganismos benéficos, que ayudan a descomponer la materia orgánica y algunos pueden actuar como antagonistas; entre estos microorganismos benéficos se registran con mayor frecuencia: algunos hongos saprófitos de los géneros ***Penicillium, Aspergillus*** y levaduras del género ***Saccharomyces*** (32).

También se pueden encontrar géneros importantes de bacterias benéficas como ***Bacillus* sp.** *y* ***Pseudomonas* sp.**, (29), (32). Algunas bacterias pertenecientes a estos géneros son conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, y varios autores han demostrado que tienen la capacidad para inducir el crecimiento y desarrollo radicular de los cultivos; de la misma manera están involucrados en la activación de señales de inducción de defensa de las plantas. De manera experimental,

estas bacterias han logrado promover el crecimiento, retrasar y disminuir la severidad de los síntomas provocados por enfermedades virales en los cultivos promoviendo el desarrollo de las mismas y retardando la aparición de síntomas (42-44).

La composición de los bioles varía considerablemente, debido a distintos factores durante su elaboración. Por lo tanto cada biol producido posee una composición diferente (27), (29), (34 – 38). Esta característica puede dificultar la reproducibilidad y comprobación científica de los resultados favorables obtenidos, además en la práctica el empleo de estos bioles no asegura el efecto positivo esperado, posterior a su aplicación (27). Sin embargo, investigaciones recientes realizadas por el CIBE-ESPOL, han logrado estandarizar el proceso de elaboración de estos biofertilizantes, estableciendo además parámetros de calidad que permiten obtener el máximo beneficio de sus componentes elementales (27), (37).

1.2.2. Métodos y proceso de Elaboración.

Los bioles se pueden producir a pequeña escala de manera artesanal, y usando procesos más elaborados, mecanizados para producirlos a escala semi-industrial o industrial (26). Es posible realizar ligeras modificaciones durante su elaboración y en los ingredientes a usar, pero siempre se deben mantener las condiciones anaeróbicas durante el proceso (25). La fermentación anaeróbica puede durar de dos a seis meses, dependiendo especialmente de factores medioambientales (36).

Como resultado del proceso de biodigestión se obtiene un sedimento acuoso, con alta calidad de fertilizante, del cual se obtienen dos componentes: la fracción liquida es conocida como biol que constituye 90% y el 10% restante, biosol (36).

Los materiales usados en su elaboración varían de una zona a otra por su disponibilidad, pero el proceso de elaboración es muy similar en la mayoría de casos. Consiste en agregar estiércol bovino en un recipiente 2/3 de su capacidad, mezclar homogéneamente con una pre-mezcla: melaza de caña, inóculo de microorganismos eficientes, bacterias acido lácticas y cascarilla de

arroz (37). Para mantener las condiciones anaeróbicas el recipiente es sellado herméticamente, es colocada una trampa para permitir la salida del biogás y mantener las condiciones de anaeróbicas. Es recomendable el enriquecimiento con minerales como azufre y potasio y además realizar reactivaciones mensuales con microorganismos y melaza de caña (27), (37).

Durante el proceso de elaboración, se puede disminuir la variabilidad de los bioles producidos, mediante la estandarización sistemática de los procesos y materiales empleados (27).

Al respecto el CIBE ha realizado investigaciones para caracterizar los parámetros físico-químicos involucrados en el proceso de fermentación de los bioles (27). Chávez *et al,* recomienda evaluar los siguientes parámetros físico-químicos para el control de la calidad final de bioles maduros: pH, conductividad eléctrica, grados brix, densidad, Materia orgánica, salinidad (ppt) y contenido de nutrientes (P, K, Ca, Mg, MN, Fe, CU, Zn) (27).

1.2.3. Principales usos de los Bioles.

Los bioles pueden ser empleados con varios propósitos y a distintos cultivos en diferentes etapas de crecimiento (26). También

pueden ser usados como fertilizantes, correctores de deficiencias y fitoestimulantes (26), (36). Recientemente se ha estudiado el efecto de los bioles en el manejo de enfermedades (38-41).

Como fuente de fitorreguladores, pueden estimular el desarrollo general de las plantas e intervenir en procesos fisiológicos como germinación, floración y fructificación. Por esto son utilizados como excelentes fitoestimuladores, para mejorar la calidad y producción de los cultivos (36). La mayoría de los bioles que se producen contienen fitohormonas (28), (29), (32), (36), las cuales son resultado del metabolismo de las bacterias involucradas durante la fermentación anaeróbica (26), (28), (36).

Mediante el uso de los bioles se podría conseguir rendimientos similares o inclusive mayores que los que se alcanzan mediante el uso de fertilizantes químicos (32-34), (37), (36).

El uso de los bioles para mejorar la nutrición de los cultivos se ha estudiado ampliamente (29-34). Cuando se realizan aplicaciones foliares, estas deben de ser ajustadas al cultivo y la etapa fenológica, sin embargo algunos autores recomiendan dosis foliares en hortalizas de entre 3% y 7% (29), mientras que otros

autores sugieren dosis superiores (5 - 12%) (45); en cultivos perennes o semiperennes, como banano y cacao, se han aplicado diluciones superiores al 75% y en algunos casos como el cultivo de cacao se han hecho aplicaciones directas del producto (33). A pesar de esto los bioles pueden causar fitotoxicidad si no son ajustadas sus diluciones optimas, para cada cultivo y etapa fenológica (41).

1.2.4. Efecto de los bioles sobre enfermedades.

El uso de los bioles como controladores de enfermedades es mucho más reciente. En experimentos desarrollados *in vitro* se ha demostrado el efecto inhibitorio de los bioles frente a algunos hongos fitopatógenos como: ***Moniliophthora roreri*** a partir de concentraciones del 5% (40) en ***Mycosphaerella fijiensis*** una inhibición total a partir del 30% (41) y un efecto fungistático sobre ***Fusarium oxysporum*** y ***Fusarium solani*** en concentraciones del 5 y 7% respectivamente (46).

Al aplicar los bioles en la superficie foliar o en la zona radicular, los microorganismos presentes en el biol actúan como antagonistas e inhiben el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos como

hongos y bacterias (47). También puede producirse la inhibición de microorganismos mediante los metabolitos secundarios producidos por las bacterias involucradas en el proceso de fermentación (40).

Hasta el momento no se han identificado los microorganismos específicos, con la capacidad de promover el crecimiento de las plantas e inhibir el desarrollo de patógenos en los bioles de producción local a pesar de esto, se conoce que los bioles producidos con estiércol, contienen grandes cantidades de microorganismos benéficos, como bacterias del género ***Bacillus*** sp. (32), las cuales pueden inducir resistencia sistémica frente a TMV plantas de tomate (***Solanum lycopersium*** L.) (42) y frente a CMV en plantas de pepino (***Cucumis sativus*** L) (43).

Las hormonas vegetales son factores importantes en la respuesta de las plantas a distintos factores bióticos (patógenos) y abióticos (medioambientales). Estas se encuentran directamente relacionadas con las señales de defensa de la planta (48), (49).

La mayoría de los trabajos que evidencian el efecto de los bioles sobre enfermedades han sido realizados bajo condiciones *in vitro* o invernadero (39-41), (46) y es bien conocido que el efecto de este

tipo de enmiendas orgánicas, bajo condiciones de cultivo es mucho menos predecible debido a que las condiciones ambientales son mucho más difíciles de controlar y podrían favorecer el desarrollo de los patógenos (25).

Investigaciones realizadas por el CIBE demuestran el efecto positivo que poseen los bioles en el incremento de la producción en los cultivos de cacao y banano, además en la disminución en la incidencia de ***Moniliophtora perniciosa*** y ***M. roreri*** en cultivos de cacao (39), (40): y recientemente ***Fusarium oxyporum*** y ***F. solani*** (46). También el efecto positivo sobre la sigatoka negra (***Micosphaerella fijiensis***), en cultivos de banano (35), (41).

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. Recolección e identificación de aislamientos virales.

El material vegetal fue recolectado mediante un muestreo dirigido en cultivos comerciales de hortalizas ubicadas en Pedro Carbo (1^0 48' 12.43'' S, 80^0 17' 16.78'' O) y Santa Elena (2^0 18' 59.11'' S, 80^0 35' 32.16'' O), pertenecientes a las provincias de Guayas y Santa Elena respectivamente. Las plantas enfermas de sandía, melón y algunas malezas (cucurbitáceas) que se colectaron, presentaban síntomas relacionados con virosis como mosaicos, bandeados de nervaduras y reducción del área foliar, de acuerdo a lo sugerido por Lecoq (9), (19).

El transporte del material vegetal se realizó bajo refrigeración hasta el laboratorio de fitopatología del CIBE-ESPOL; se determinó la identidad de los virus presentes en las muestras mediante el uso de la prueba serológica DAS-ELISA y diagnosticadores específicos para SqMV (V054-K2) producidos por AC Diagnostics, Inc. (Arkansas, EEUU). Adicionalmente se comprobó la presencia de otros patógenos virales como el virus de la mancha anular del papaya raza sandía (PRSV-W), el

virus del mosaico de la sandía (WMV-2) y el virus del mosaico del pepino (CMV), enfermedades frecuentes en cucurbitáceas.

2.2. Conservación *in vivo* de aislamientos virales.

Se realizó el mantenimiento de una fuente estable del virus del mosaico de la calabaza (SqMV) con el objetivo de disponer permanentemente del inóculo viral necesario para realizar transmisiones mecánicas en las plantas que se utilizaron en esta investigación.

El inoculo viral fue conservado y multiplicado, realizando inoculaciones mecánicas periódicas (cada dos semanas) de las muestras de plantas enfermas (sintomáticas) y positivas para SqMV, en plantas de melón sanas (7-10 días después de trasplantadas). Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero.

La inoculación mecánica en las plantas de melón se realizó siguiendo los protocolos recomendados por Mathews (3) y Burns (50). Para confirmar la presencia de SqMV en las plantas inoculadas se usaron pruebas serológicas DAS-ELISA, tal como se describió en el epígrafe anterior.

Las plantas sanas de melón (***C. melo*** L.) empleadas en la conservación y multiplicación de SqMV fueron cultivadas en sustrato compuesto por:

tierra de sembrado 40%, sustrato reciclado 20 %, esfagno 20 %, arena 5%, cascarilla de arroz 5 % y humus de lombrices 10%. El sustrato fue esterilizado a 120 ^{o}C por 40 minutos. Durante la etapa de germinación se aislaron las plántulas de insectos vectores y otros artrópodos mediante el uso de armazones de aluminio y malla antiáfido (Nylon Jordan®).

2.3. Evaluación del efecto de bioles en condiciones de invernadero.

Con el propósito de evaluar el efecto de los bioles sobre plantas de melón infectadas por el virus del mosaico de la calabaza, se implementó un diseño experimental de bloques completos al azar conformado por tres repeticiones y diez réplicas por cada tratamiento. Los tratamientos se describen en la Tabla 1:

Tabla 1. Descripción de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Inoculación SqMV	Aplicación foliar Biol	Dosis biol
1	X	x	5 %
2	X	x	10 %
3	X	x	15 %
4	X	x	25 %
5 (Testigo enfermo)	X	-	-
6 (Testigo sano)	-	-	-

Si= (**x**), No= (**-**)

El experimento se realizó bajo condiciones semicontroladas (25-32 ^{0}C, 80-90% HR); las unidades experimentales fueron protegidas de insectos vectores y otros artrópodos usando mallas de nylon. Se garantizó la ausencia de vectores e insectos en general en los cubículos del invernadero.

La nutrición y el riego de las unidades experimentales se mantuvieron homogéneas durante todo el tiempo de experimentación, suministrando los nutrientes en forma de soluciones nutritivas, de acuerdo a las recomendaciones de Sánchez *et. al.* (51), tal como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de las soluciones nutritivas utilizadas.

	Soluciones Nutritivas	**Dosis mg/planta/ día**	
Nutriente	**Fuente**	**0-35 días**	**35-65 días**
Nitrógeno	Nitrato de Amonio	73.1 mg	256.9 mg
Fosforo	Ácido Fosfórico	6.4 mg	30.1 mg
Potasio	Nitrato de Potasio	75.9 mg	465.3 mg
Calcio	Nitrato de Calcio	84 mg	642.5 mg
Magnesio	Sulfato de Magnesio	18.13 mg	187.1 mg

La solución nutritiva aplicada, presentó rangos de pH entre 6.5-7.5 y valores de conductividad eléctrica entre 1700 -1800 µS/m.

Cada unidad experimental consistió en una planta de melón (***Cucumis melo*** L. var. Edisto), sembrada en bandejas germinadoras con sustrato BM2® producido por Berger – Canadá. El trasplante se realizó en sustrato compuesto por zeolita y esfagno en proporción 1:1 (v:v) previamente esterilizado (120^0 C durante 40 min) a los diez días después de la siembra en las bandejas. Además se colocaron tutores con la finalidad de promover el crecimiento vertical de las plantas y evitar el contacto entre ellas.

Las plantas se inocularon con el virus del mosaico de la calabaza siete días posteriores al trasplante. Excepto el tratamiento 6 (testigo sano), todas las demás plantas fueron inoculadas.

Los bioles usados en esta investigación fueron elaborados en Santa Rosa como parte del proyecto PL-480 (Programa de tecnologías innovativas y ambientalmente amigables para la recuperación de plantaciones de cacao fino de aroma) en la provincia de El Oro, bajo los parámetros de calidad CIBE-ESPOL (patente pendiente). Se aplicaron usando una bomba de aspersión manual de 5 L; el gasto de agua para la aplicación de bioles fue ajustado de manera que se asegure la cobertura total del área foliar, y se dirigieron con la ayuda de una pantalla plástica.

Una vez que las unidades experimentales fueron inoculadas con SqMV, se procedió a la aplicación de bioles, siete días después de la inoculación viral. Se aplicó el biofertilizante líquido con una frecuencia semanal y durante cinco semanas. Al final de la evaluación se confirmó la presencia de SqMV en las plantas tratadas, mediante el uso de la prueba serológica DAS-ELISA.

El efecto de los bioles en las plantas infectadas por el virus del mosaico de la calabaza, se midió en base a las siguientes variables: *longitud de las plantas* -tomada desde la base del tallo hasta el último brote-; *número de hojas* por planta y el índice de *severidad*.

Tabla 3. Escala de evaluación de síntomas.

Categoria	***Descripción de síntomas***
0	Planta sin sintomas
1	Sintomas iniciales: VBL, VCL, M, MtL, CL
2	Sintomas bien definidos: VBM, VCM, DFL
3	Sintomas severos: VBS, VCS, DFL en hojas nuevas
4	Sintomas muy severos: VBS, VCS, DFM , AS
5	Sintomas muy severos; VBS, VCS, AS, DFS y detención de crecimiento
6	Muy severos, con muerte de la planta.

Sintomas		**Nivel de intensidad**
VB: Aclaramiento de nervaduras	C= Clorosis	L: Ligero
VC: Aclaramiento de nervaduras	DF: Distorsión foliar	M: Moderado
M: Mosaicos	A: Ampollamientos	S: Severos
Mt: Moteados		

La escala de síntomas que se muestra en la tabla 3, fue diseñada en base a la sintomatología observada en plantas de melón infectadas con SqMV, con el objetivo de determinar el índice de severidad en cada tratamiento mediante la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{\sum_{i=1}^{k} X_{ki} \cdot N_{ki}}{N_j}$$

Fórmula de Towsend – Heuberger (52); Dónde: IS= Índice de severidad; X_{ki} = Severidad evaluada en el momento i; N_{ki}= Número de plantas con el nivel del daño en el momento i y N_j= número total de plantas evaluadas.

El índice severidad es una media aritmética, que pondera los valores de severidad obtenidos en un grupo de plantas, de tal manera que índices de severidad bajos se relacionan con tratamientos donde exista una mayor cantidad de plantas con síntomas leves a moderados; lo contrario sucede con índices altos.

El progreso de la severidad en el tiempo fue analizado, graficando los índices de severidad obtenidos en el tiempo para cada tratamiento. Complementariamente, los índices de severidad obtenidos de cada réplica se ajustaron al modelo ($f(x) = ax^2 + bx + c$), y para establecer

diferencias estadísticas entre las curvas de cada tratamiento, se realizó un análisis de la varianza del coeficiente (*a*), correspondiente al término cuadrático del modelo. El coeficiente *a* con valores de *x*, *b*>0 en el modelo, determina la forma de la curva de progreso de la severidad durante las evaluaciones realizadas; valores de *a*<0 se relacionan con curvas de tipo convexas, las cuales indican el incremento continuo de la severidad en el tiempo, y los valores *a*>0 con curvas de tipo cóncava, que indica un incremento decreciente en la severidad de los síntomas.

La tendencia de los síntomas y el nivel de severidad observado con mayor frecuencia en cada tratamiento, se analizó mediante el cálculo de la moda de los valores de severidad (sin transformaciones).

Para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos, se utilizó ANOVA (Análisis de la varianza). Previa comprobación de los supuestos necesarios, la normalidad del conjunto de datos fue comprobada usando la prueba de de Shapiro Wilks, con un nivel de significancia (p=0.05). Los rangos de significancia, se obtuvieron usando la prueba de LSD Fisher al 5% de probabilidad.

Además se realizó un análisis de correlación entre las variables, calculando el coeficiente de Pearson y un nivel de significancia del 5%.

El análisis estadístico completo se realizó usando el software estadístico Infostat 2011® (53), (54).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación y mantenimiento de aislamientos virales.

Identificación de aislamientos virales.

En total se analizaron 174 muestras de material vegetal enfermo colectado en cultivos de melón y sandía. En la tabla 4 se muestran los resultados de las pruebas serológicas realizadas para el virus del mosaico de la calabaza. La mayor cantidad de muestras positivas provienen del cantón Pedro Carbo en cultivos de melón (***Cucumis melo*** L.).

Tabla 4. Resultados de la detección imnunoenzimática de SqMV.

Localidad	Especie vegetal	Número de plantas evaluadas	Reacciones Positivas a SqMV
Santa Elena	*Citrullus lanatus*	34	0
	Cucumis melo	13	3
Pedro Carbo	*Citrullus lanatus*	13	4
	Cucumis melo	114	16
	Total	174	23

SqMV= *Squash mosaic virus*

UDO plantas positivas 0,205 - 2,43
UDO control positivo 1,47 - 3,45
UDO control negativo 0,063 - 0,105

También se detectó la presencia de virus de la mancha anular de la papaya raza sandía (PRSV), virus del mosaico de la sandía (WMV2) y virus del mosaico del pepino (CMV) en las muestras analizadas; estos datos no se muestran en la tabla. El virus del mosaico de la calabaza también fue identificado en malezas del género ***Centrosoma*** sp., que actúan como reservorio del virus e importantes fuentes de inóculo.

Conservación in vivo de aislamientos virales.

El virus del mosaico de la calabaza (SqMV) fue conservado y multiplicado *in vivo* mediante inoculaciones periódicas en plantas de melón (***C. melo***) bajo condiciones semicontroladas de invernadero, se consiguió una eficiencia en la transmisión mecánica de SqMV en plantas de melón del 100%. Durante la conservación del inoculo viral, se observaron síntomas de mayor intensidad en un menor intervalo de tiempo (7-8 ddi) en plantas inoculadas a los 8-10 ddt, en comparación con las plantas inoculadas a partir de los 25 ddt donde la expresión de síntomas ocurrió entre los 18-20 ddi, con síntomas leves e incluso plantas asintomáticas (Figura 3.1).

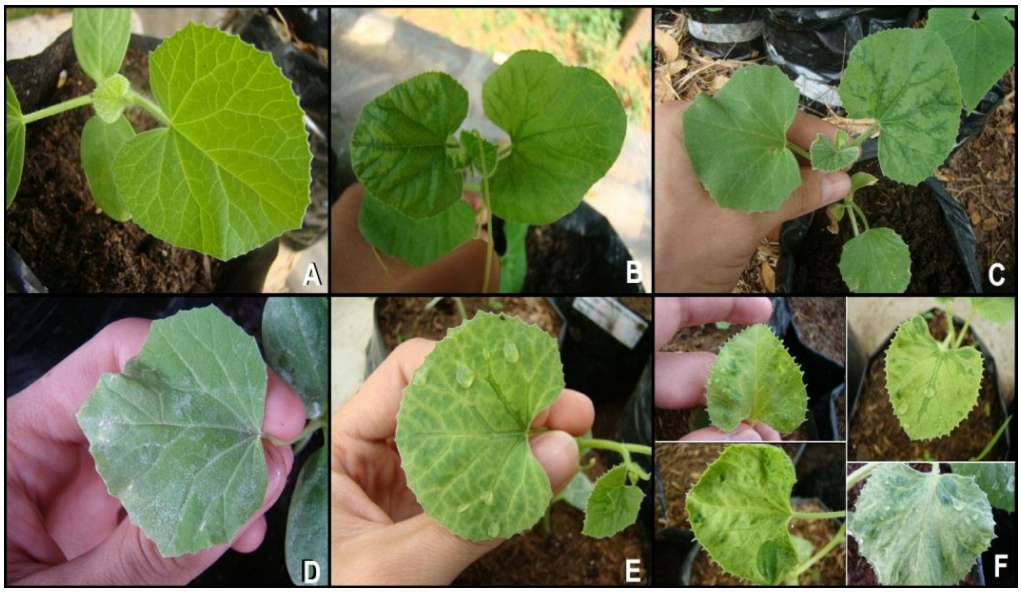


Figura 3.1 Inoculación mecánica de SqMV, síntomas observados.

A-C. Plantas de melón inoculadas con SqMV a los 18-20 ddt.

D-F. Plantas de melón inoculadas a los 8-10 ddt.

3.2. Evaluación del efecto de los bioles bajo condiciones de invernadero.

Luego de las aplicaciones de los bioles no se observó fitotoxicidad en las plantas tratadas, en ninguna de las dosis utilizadas. De acuerdo con investigaciones desarrolladas por Quito (35), aplicaciones de biol al 70% (v:v) en pueden llegar a presentar un efecto fitotóxico en plantas de banano.

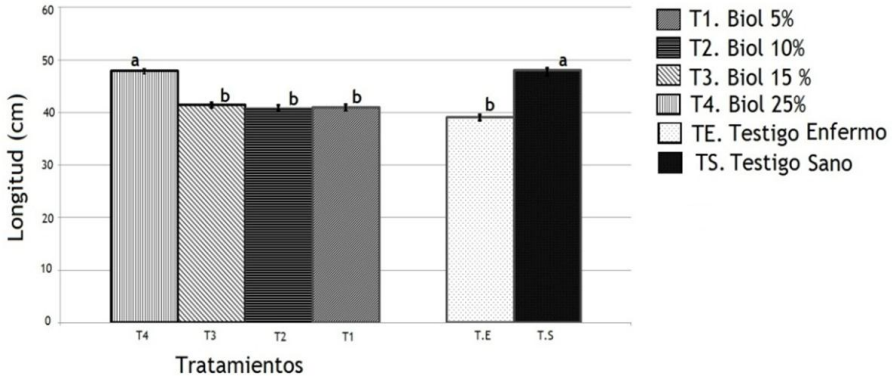
Al final de las evaluaciones, mediante la técnica serológica DAS-ELISA se confirmó la infección de las unidades experimentales inoculadas con SqMV, donde todas las muestras inoculadas inicialmente con SqMV resultaron positivas (2.495 - 3.671 UDO). De la misma manera se confirmó la ausencia de SqMV, las unidades experimentales del testigo sano resultaron negativas (0.066 - 0.083 UDO). Las muestras fueron consideradas positivas para SqMV, cuando el valor promedio de las lecturas; fue dos veces mayor al valor de la media de los controles negativos (0.0635 - 0.118 UDO). El rango de lecturas de los controles positivos fue 0.5215 - 1.8495 UDO.

Las variables estudiadas fueron analizadas por separado:

Longitud de planta

La longitud (cm) promedio de los tratamientos, a los 42 ddi, se muestra en la figura 3.2.

Los datos experimentales fueron sometidos a un Análisis de varianza (ANOVA). En el ANOVA se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (1%).



Tratamiento [i]	Longitud (cm) [ii]	
T4. Biol 25%	47.85[†] ± 0.5	a [v]
T3. Biol 15%	41.37 ± 0.52	b
T2. Biol 10 %	40.91 ± 0.47	b
T1. Biol 5%	40.95 ± 0.59	b
Testigo enfermo [iii]	39 ± 0.54	b
Testigo sano [iv]	47.99 ± 0.47	a
CV (%)	19.07	
Modelo		
***F** test*	7.56 **	
Valor p	<0.0001	

i Aplicación foliar de biol, a partir de los 7 ddi (Días después de la inoculación con SqMV), frecuencia de aplicación semanal.

ii Longitud de las plantas a los 42 ddi (días posteriores a la inoculación).

iii Plantas inoculadas sin aplicación de bioles.

iv Plantas sin inocular y sin aplicaciones de bioles.

v Comparaciones estadisticas entre tratamientos, letras distintas muestran diferencias significativas usando el test LSD Fisher con α=0.05

† $\bar{X}$ ± sem; sem = √ (σ/n)

* Diferencias estadisticas significativas (p≤0.05) y ** altamente significativas (p≤0.01)

n.s: No se econtraron diferencias estadisticas entre las repeticiones

Figura 3.2 Efecto de la aplicación foliar de biol el promedio de longitud de las plantas, 42 ddi.

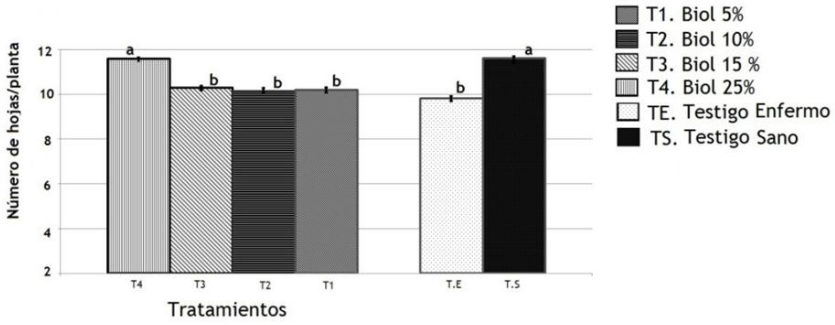
La prueba *a posteriori* LSD Fisher al 5% de probabilidad, mostró diferencias significativas entre el tratamiento 4 (biol 25%) con una longitud de 47,85 cm, similar al testigo sano 47,9 cm, estos tratamientos presentaron diferencias con el testigo enfermo el que presentó una longitud final de 39 cm.

Número de Hojas

El número de hojas promedio para cada tratamiento a los 42 ddi, es mostrado en la figura 3.3.

La variable fue sometida a un ANOVA, donde se detectaron diferencias significativas al 5%, entre los tratamientos.

Los resultados de la prueba de significación LSD Fisher al 5%, son mostrados en la figura 3.3, donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de biol al 25%, el testigo enfermo y el testigo sano, siendo el testigo sano quien presentó un mayor número de hojas (11,2), seguido del tratamiento 4 (biol 25%) con 10,7; mientras que el testigo enfermo promedio 7,67 en este parámetro. Los tratamientos restantes (biol al 5, 10 y 15%) no presentaron diferencias de importancia relevante para la investigación.



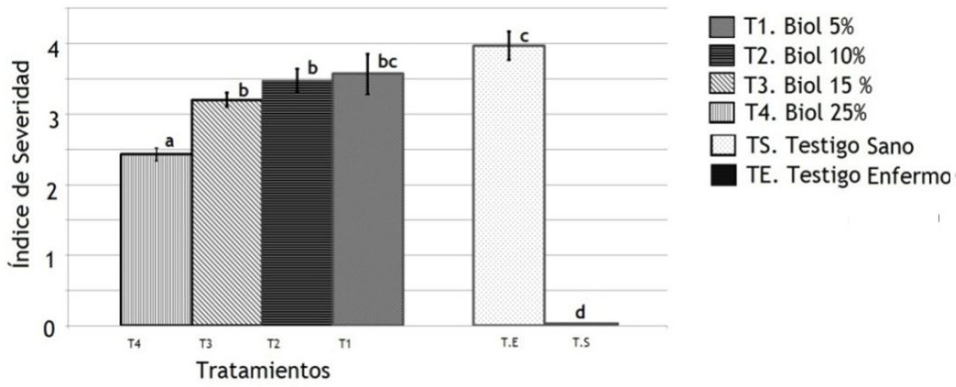
Tratamiento [i]	Número de hojas [ii]	
T4. Biol 25%	10.27[†] ± 0.23	a [v]
T3. Biol 15%	9.47 ± 0.18	b
T2. Biol 10 %	8.23 ± 0.17	c
T1. Biol 5%	7.87 ± 0.16	cd
Testigo enfermo [iii]	7.67 ± 0.15	d
Testigo sano [iv]	11.20 ± 0.2	e
CV (%)	11.7	
Modelo		
F test	28.56 **	
Valor p	<0.0001	

i Aplicación foliar de biol, 7 ddi (días después de la inoculación con SqMV), frecuencia de aplicación semanal.
ii Número de hojas por planta a los 42 ddi
iii Plantas inoculadas sin aplicación de biol.
iv Plantas sin inocular y sin aplicaciones de biol
v Comparaciones estadisticas entre tratamientos, letras distintas muestran diferencias significativas usando el test LSD Fisher con α=0.05
† $\bar{X}$ ± sem; sem = √(σ/n)
* Diferencias estadisticas significativas (p≤0.05) y ** altamente significativas (p≤0.01)
n.s: No se econtraron diferencias estadisticas entre las repeticiones

Figura 3.3 Efecto de la aplicación foliar de biol sobre el número de hojas por planta, 42 ddi.

Índice de severidad.

En la figura 3.4 se muestran los valores promedios de los índices de severidad para cada tratamiento, a los 42 ddi.



Tratamiento [i]	Índice de severidad [ii]	
T4. Biol 25%	2.43† ± 0.09	a [v]
T3. Biol 15%	3.2 ± 0.10	b
T2. Biol 10 %	3.47 ± 0.17	b
T1. Biol 5%	3.57 ± 0.32	bc
Testigo enfermo [iii]	3.97 ± 0.28	c
Testigo sano [iv]	0.0	d
CV (%)	9.54	
Modelo		
F test	65.89 *	
Valor p	<0.0001	

i Aplicación foliar de biol, 7 ddi (días despues de la inoculación con SqMV), fecuencia de aplicación semanal.

ii Indice de severidad: representa la media ponderada de severidad a los 42 ddi usando una escala entre 0-6, como se describe en el procedimiento experimental

iii Plantas inoculadas sin aplicación de bioles.

iv Plantas sin inocular y sin aplicaciones de bioles.

v Comparaciones estadisticas entre tratamientos, letras distintas muestran diferencias significativas usando el test LSD Fisher con α=0.05

† $\bar{X}$ ± sem; sem = V (σ/n)

* Diferencias estadisticas significativas (p≤0.05) y ** altamente significativas (p≤0.01)

n.s: No se econtraron diferencias estadisticas entre las repeticiones

Figura 3.4 Efecto de la aplicación foliar de biol sobre el índice de severidad, 42 ddi.

Mediante un ANOVA se detectaron diferencias significativas al 5% de probabilidad. Los resultados del análisis *a posteriori*, en este caso la prueba de significancia estadística LSD Fisher (p=0.05), para la variable

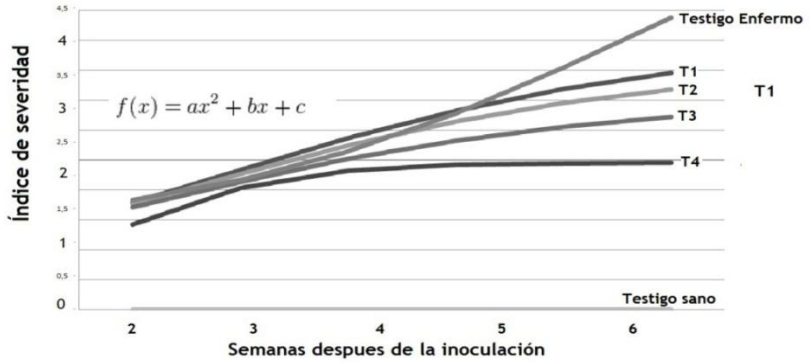
índice de severidad, donde los menores índices fueron observados en el tratamiento 4 con un valor de 2,43; mientras que el testigo enfermo presentó una severidad del 3,97, valor estadísticamente significativo, por otra parte los demás tratamientos 1 (biol 5%), 2 (biol 10%) y 3 (biol 15%) mostraron valores símiles entre sí 3,57, 3,47, y 3,2 respectivamente.

Figura 3.5 Intensidad de síntomas observados en plantas de melón infectadas con SqMV y tratadas con distintas dosis de biol, 42 ddi.

A. Testigo Sano (Plantas sin inocular y sin aplicación de biol.
B. Testigo Enfermo (Plantas inoculadas sin aplicación de bioles)
C. Tratamiento 1. Plantas inoculadas con aplicación foliar de biol (5%, v:v)
D. Tratamiento 2. Plantas inoculadas con aplicación foliar de biol (10%, v:v)
E. Tratamiento 3. Plantas inoculadas con aplicación foliar de biol (15%, v:v)
F. Tratamiento 4. Plantas inoculadas con aplicación foliar de biol (25%, v:v)

El progreso del índice de severidad (IS) en el tiempo se grafica en la figura 3.6, donde se puede observar que no existen diferencias notables entre el índice de severidad de los tratamientos durante las primeras semanas post inoculación. Sin embargo a partir de la cuarta y la quinta semana post inoculación, se observa una tendencia creciente del índice de severidad en el testigo enfermo (Plantas inoculadas, sin aplicación de biol). Esta tendencia se puede explicar con el coeficiente *a* de 0.00160 obtenido del modelo, que indica un incremento creciente a partir de la cuarta semana; además es estadísticamente diferente a los demás tratamientos, por lo que la forma de esta curva de progreso es distinta.

También se destaca la estabilización del índice de severidad en el tratamiento cuatro (Biol al 25%) a partir de la quinta semana post inoculación. La tendencia de crecimiento decreciente y la forma de la curva de progreso de la severidad se explica con el coeficiente *a* negativo de -0.00320. El coeficiente *a* obtenido es estadísticamente diferente a los demás tratamientos incluidos el testigo enfermo, lo que comprueba que la curva de progreso de severidad en este tratamiento es diferente a los demás.



Análisis de la varianza

Tratamiento [i]	Est. Coef. (*a*) [ii]	
T4. Biol 25%	-0.00320	a [v]
T3. Biol 10%	-0.00070	b
T2. Biol 15%	-0.00063	b
T1. Biol 5%	-0.00047	b
Testigo enfermo [iii]	0.00160	c
Testigo Sano [iv]	0.00000	
C.V	111.06	
F test	12.68*	
Valor p	0.0006	

i Aplicación foliar de biol, siete días después de la inoculación de SqMV, frecuencia de aplicación semanal.

ii Valores estimados para el coeficiente a, de la función polinómica de grado 2

iii Plantas inoculadas sin aplicación de bioles.

iv Plantas sin inocular y sin aplicaciones de bioles.

v Comparaciones estadísticas entre tratamientos, letras distintas muestran diferencias significativas usando el test LSD Fisher con α=0.05

* Diferencias significativas

Figura 3.6 Progreso de la severidad en el tiempo para cada tratamiento.

Los tratamientos 3, 2, 1 comparten la misma tendencia y forma de la curva de progreso de la severidad; ligeramente crecientes a partir de la

tercera semana, lo cual se evidencia en la prueba de significancia realizada a los coeficientes (*a*), que los muestra como similares entre sí.

En la tabla 5, se presentan los valores de severidad observados con mayor frecuencia (moda) para cada tratamiento durante las cinco evaluaciones. Estos valores son obtenidos a partir de la escala de evaluación de síntomas.

Tabla 5. Valores de severidad observados con mayor frecuencia (Moda) por tratamiento.

Tratamientos [a] / Evaluaciones b	Ev. 1	Ev. 2	Ev. 3	Ev. 4	Ev. 5
T1 (Biol 5%)	2 [e]	2	3	4	4
T2 (BIol10%)	2	2	3	3	4
T3 (Biol 15%)	1	2	3	3	3
T4 (Biol 25%)	1	2	2	2	2
Testigo enfermo [c]	2	3	3	3	4
Testigo Sano [d]	0	0	0	0	0

a Aplicaciones semanales de bioles en plantas infectadas por SqMV
b Evaluaciones semanales, a partir de la segunda semana post inoculación
c Plantas inoculadas con SqMV, sin aplicación de biol
d Plantas sanas, sin aplicación de biol
d Evaluaciones realizadas una semana posterior a la aplicación de biol
e Sintomas evaluados en base la escala de severidad (0-6).

En el tratamiento cuatro a partir de la segunda evaluación, el valor de severidad observado con mayor frecuencia fue dos (2), inferior con respecto a los otros tratamientos y se mantuvo constante desde la segunda hasta la cuarta evaluación, lo que indica que los síntomas más

frecuentes en este tratamiento fueron aclaramientos y bandeados de nervaduras moderados y ligeras deformaciones foliares. Estos valores en comparación a los evaluados en los demás tratamientos demuestran el efecto que tienen los biofertilizantes sobre el desarrollo de la enfermedad.

En el testigo enfermo el valor inicial de severidad observado con mayor frecuencia fue dos (2) y al final de la evaluación cuatro (4). Entonces los síntomas más frecuentes al inicio fueron aclaramiento y bandeados de nervaduras moderados, para finalizar en síntomas muy severos con deformación foliar y ampollamiento severos. Por otro lado el comportamiento de los demás tratamientos (3,2 y 1) fue muy similar entre sí.

Análisis de correlación.

El análisis de correlación, evidenció las siguientes correlaciones (Tabla 6). El índice de severidad está correlacionado negativamente con las variables longitud (r= - 0.42) y número de hojas por planta (r= - 0.6); los coeficientes de correlación son estadísticamente significativos al 5%. Esto indica que la severidad de los síntomas producidos, influye negativamente en el crecimiento de la planta afectando su desarrollo vegetativo normal.

Tabla 6. Análisis de correlación de las variables.

Correlación	r [a]		*Valor p*
I.S vs Longitud	-0.42	*	<0.0001
I.S vs Número de hojas	-0.6	*	<0.0001
Dosis Biol vs I.S	-0.85	*	<0.0001
Longitud vs Número de hojas	0.24	*	0.0037
Longitud vs Dosis de biol	0.31	*	<0.0001
Dosis de biol vs número de hojas	0.66	*	<0.0001

a. Coeficiente de correlación de Pearson.
* Correlación estadisticamente significativa al 5% de probabilidad

La dosis de los bioles está correlacionada positivamente con el número de hojas (r = 0.66) y la longitud de las plantas (r = 0.31); lo que indica que las dosis de bioles influyen positivamente en el número de hojas por planta y la longitud de las plantas infectadas con SqMV.

Por el contrario, la dosis del biol presentó una alta correlación negativa (estadísticamente significativa) con el índice de severidad (r= - 0.85), lo que sugiere una disminución de la severidad de los síntomas observados al aumentar la dosis del biol.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la aplicación foliar de biol en dosis del 25%, producen una mejora significativa en el crecimiento de las plantas y contribuyó a la disminución en la severidad de síntomas en plantas infectadas por SqMV bajo condiciones de

invernadero durante la etapa vegetativa. Aunque numerosos estudios han demostrado la capacidad estimuladora del crecimiento del biol (29-35), no se han realizado investigaciones previas con el propósito de evaluar el efecto de los bioles de producción local sobre el crecimiento de plantas infectadas por virus.

Además se evidenció la disminución estadísticamente significativa (26%), del índice de severidad respecto al testigo enfermo; aunque el porcentaje de esta disminución podría considerarse leve o moderado, es muy importante conocer que es posible disminuir el índice de severidad de la infección viral mediante la aplicación de bioles. Sin embargo no existen referencias de estudios similares hasta el momento.

El incremento en longitud y la disminución en la severidad de síntomas, se los puede relacionar con el efecto estimulador del crecimiento del biol, debido a su composición rica en hormonas vegetales como auxinas y giberelinas, además de micronutrientes (27), (36).

En las plantas infectadas se producen alteraciones metabólicas tales como la disminución de la fotosíntesis y de la cantidad de sustancias reguladoras del crecimiento (fitohormonas), así como la reducción de la tasa de absorción de algunos nutrientes importantes tales como el

nitrógeno (2), (35). El aporte de los bioles puede mejorar el estado, nutricional y compensar los bajos niveles hormonales que sufren las plantas viróticas. No existen resultados publicados comparables a los obtenidos en este trabajo, por lo que sería de interés profundizar en los cambios bioquímicos y moleculares de las plantas tratadas con bioles, con la finalidad de explotar mejor la utilidad de los bioles de producción local. Por otro lado se destaca la riqueza biológica de los bioles y a pesar de que no se han identificado detalladamente los microorganismos presentes en los bioles de producción local, se conoce que ***Bacillus*** sp. y ***Pseudomonas*** sp, pueden estar presentes (36), Varias investigaciones señalan a estas bacterias típicas de la rizósfera, como inductoras de resistencia y promotoras de crecimiento en plantas infectadas por virus en distintos cultivos (42-44). Estos microorganismos benéficos pueden habitar en la rizósfera, y vivir como endófitos, son capaces de sintetizar fitohormonas involucradas en el crecimiento de las plantas y en la respuesta a enfermedades, por lo cual es bien conocido su efecto estimulador de crecimiento e inductor de resistencia a enfermedades (44).

Esta investigación deja una puerta abierta para la continuación de estudios relacionados con este tema, ya que mediante este trabajo se ha obtenido robusta evidencia sobre el efecto que tienen los bioles de

producción local sobre el desarrollo de las enfermedades virales y en la nutrición general del cultivo. A pesar que este estudio no fue llevado hasta el periodo de cosecha, se logró observar un efecto positivo durante la etapa vegetativa, pudiéndose esperar resultados favorables al momento de la cosecha. La etapa vegetativa de los cultivos de ciclo corto es considerada crítica para obtener niveles de producción óptimos en el cultivo.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones.

A partir de los resultados obtenidos es posible enunciar las siguientes conclusiones:

1. Se comprobó la presencia de SqMV en las muestras de melón evaluadas y se estandarizó el método para la inoculación y mantenimiento del aislamiento viral. El estado fenológico ideal de las plantas para la inoculación del virus, fue de 8-10 días después del trasplante.
2. La aplicación foliar de biol en dosis al 25% (v:v), con una frecuencia de aplicación semanal en plantas infectadas por SqMV, promueve el crecimiento, favorece la emisión foliar y reduce en un 26% la severidad de los síntomas causados por el virus del mosaico de la calabaza en plantas de melón.

4.2. Recomendaciones.

A partir de los resultados obtenidos, se emiten las siguientes recomendaciones:

1. Realizar estudios más detallados del efecto de los bioles sobre enfermedades virales y los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados.
2. Evaluar otros modos de aplicación de los bioles y dosis superiores al 25%.
3. Continuar investigaciones en campo, con la finalidad de evaluar el efecto las aplicaciones de biol sobre el rendimiento de los cultivos en plantas enfermas.
4. Continuar las investigaciones, dirigidas a estudiar el efecto individual de los compuestos químicos y microorganismos presentes en los bioles de producción local.

BIBLIOGRAFÍA.

1. FAO, 2008. “FAOSTAT - Producción agrícola”. (En línea). Disponible en: http://www.fao.org/corp/statistics/es/. Consultado en mayo 2011
2. AGRIOS, G. 2005. “Plant Pathology”. Fifth Edition. Amsterdam. p. 952.
3. HULL, R. 2009. “Comparative plant virology”. Second Edition. Norwich: Elsevier. p. 400.
4. CACIAGLI, P. 2009. “Vegetable Viruses” en Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Mahy, B., & Van Regenmortel, M. Eds. Academic Press. pp. 479-487
5. EL DIARIO. 2007. “El virus anónimo sigue destruyendo cultivos” (En línea). Disponible en: http://www.eldiario.com.ec/noticias-manabi-ecuador/41725-el-virus-anonimo-sigue-destruyendo-cultivos/. Consultado en marzo 2011.
6. ZITTER, T., HOPKINS, D. & THOMAS, C. 2004. “Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas”. Madrid: Mundi-Prensa.. p. 88.
7. MAHY, B., VAN REGENMORTEL, M. 2009. “Desk Encyclopedia of plant and fungal virology”. Academic Press. p. 632.
8. LOEBENSTEIN, G., THOTTAPPILLY, G. 2004. “Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in Developing Countries”. The Netherlands: Kluwer Academic. p. 840.

9. LECOQ, H., WISLER, G. & PITRAT, M. 1998. “Cucurbit viruses: the classics and the emerging,” en Cucurbitaceae, vol. 98, pp. 126–142.
10. PROVVIDENTI R., HAUDENSHIELD, J. 1996. “Squash Mosaic,” en Compendium of Cucurbit Diseases. Zitter, T. & Thomas. Eds. American Phytopathological Society. pp. 41-42.
11. HAUDENSHIELD, J., PALUKAITIS, P. 1998. “Diversity among isolates of squash mosaic virus.,” The Journal of General Virology, vol. 79 (10), pp. 2331-41
12. ARDEN, A. SHERF, F., 1986 “Vegetable diseases and their control”, 2nd ed. Wiley-Interscience, p. 736.
13. ESPINOZA LOZANO, L., PERALTA, E., PAREDES MONTERO, J.R. & ALVAREZ, R. 2011. “Determinación de Géneros y Especies Virales que se encuentran afectando a las Cucurbitáceas en la Zona de Pedro Carbo, Provincia del Guayas”. Revista Tecnológica-ESPOL, 23, p. 33-40.
14. PRENDEVILLE, H. 2010. "Ecological effects of virus-resistant transgenic squash". ETD collection for University of Nebraska - Lincoln. p.100. Disponible en: http://digitalcommons.unl.edu/dissertations/AAI3428318
15. JOSSEY, S. & BABADOOST, M. “Occurrence and Distribution of Pumpkin and Squash Viruses in Illinois”. Plant Disease. 92(1), pp. 61 - 68

16. PAREDES, J. 2011. “Capacidad de dos especies de áfidos (HOMÓPTERA: APHIDIDAE) para transmitir Squash Mosaic Virus - SqMV en melón bajo condiciones de invernadero e identificación de sus enemigos naturales”. Tesis de grado Escuela Superior Politécnica del Litoral. p. 96.
17. DEPARMENT OF CROP SCIENCES / UNIVERSITY OF ILLINOIS, 1999. “Mosaic Disease of Cucurbit”, no. 926. p. 9.
18. GARCIA-ARENAL, F., PALUKAITIS, P. 2010. “Cucumber Mosaic Virus,” en Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology, Elsevier., B. W. J. Mahy & Van Regenmortel, M. Eds. Academic Press, pp. 171-176.
19. LECOQ, H. 2003. “Cucurbits,” en Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries, Loebenstein G. & Thottappilly, G. Eds. Springer. pp. 655-688.
20. PURCIFULL, D., HIEBERT, E. 1979.“Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates.,” Phytopathology, vol. 69, pp. 112-116,.
21. LECOQ, H.,DESBIEZ, C. 2009 .“Watermelon Mosaic Virus and Zucchini Yellow Mosaic Virus”. en Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology, Elsevier. Mahy, B., Van Regenmortel, M. Eds. Academic Press. p. 632.
22. DESBIEZ, C., LECOQ, H. 1997. “Zucchini yellow mosaic virus,” Plant Pathology, vol. 46, no. 6, pp. 809-829.

23. LISA, V., BOCCARDO, G., D'ANGOSTINO, G., DELLAVALLE, G., &D'AQUILIO, M. 1981. "Zucchini Yellow Mosaic" Phytopathology, vol. 71, pp. 662-72.

24. GONSALVES, D., SUZUKI, J., &TRIPATHI, S. 2009. "Papaya Ringspot Virus," en Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology, B. W. J. Mahy & M. H. V. Van Regenmortel, Eds. Academic Press, pp. 250-257.

25. LITTERICK, A., WOOD, M. 2009. "Chapter 5. The use of composts and compost extracts in plant disease control," en Disease Control in Crops: Biological and Environmentally-Friendly Approaches, Dale Walters, Ed. Edinburgh, UK: Wiley-Blackwell, pp. 93-117.

26. SUQUILANDA, M. 1996."El Biol - Fitoestimulante orgánico," en Agricultura Orgánica, Fundagro., Quito: Fundagro. p. 220-251.

27. ORELLANA, T, MANZANO P, CHÁVEZ, E, RUÍZ, O, LEÓN R, ORELLANA, A Y PERALTA, E., 2011, "Caracterización de los parámetros Físico - Químicos en el proceso de fermentación y maduración artesanal de Bioles. Memorias del I Congreso Binacional de Investigación en Ciencia y Tecnología de las Universidades del Norte del Perú y del Sur de Ecuador. Universidad Nacional de Piura-UNP. (En prensa).

28. MANZANO, P., CHÓEZ, I., AYLLÓN, M., ORELLANA-MANZANO & PERALTA, E. 2010. “Determinación de fitohormonas en enmiendas orgánicas liquidas (bioles),” en XIX Reunión Internacional ACORBAT, no. 1, p. 580.

29. BASANTES, D. 2010. “Elaboración y aplicación de dos tipos de Biol en el cultivo de brócoli (Brassica oleraceavar. legacy),”. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. p. 123. Disponible en: http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/352???help.index???

30. BALDEÓN, P. 2009. “Efecto de la aplicación de biol activado y silicio en la calidad del cultivo de alcachofa (Cynaras colymus L.) en Latacunga, Ecuador,”. Tesis de Grado. Zamorano, Honduras. p. 25. Disponible en: http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2009/T2732.pdf

31. WONG M., JIMÉNEZ, E. 2009. “Comparación Del Efecto De 2 Biofertilizantes Líquidos A Base De Estiércol Caprino Y Vacuno Sobre Parámetros De Crecimiento De Algarrobo (Prosopis Juliflora (Sw.) Dc.) En Fase De Vivero,” Bosque. p. 7.

32. SANTAMARÍA, D. 2009. “Evaluación microbiana, hormonal y nutricional de ocho formulaciones en la preparación de biol y su aplicación en tres dosis en el cultivo de palmito (Bactris Gasipaes HBK),”. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Ejército. p. 162. Disponible en: http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2595

33. PINO, C. 2009. “Determinación De La Mejor Dosis De Biol En El Cultivo De (Musa Sapientum) Banano, Como Alternativa A La Fertilización Foliar Química,”. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Tesis de grado p. 11. Disponible en: http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/1739

34. ARGÜELLO, D. 2010. “Comparación de la Acción de Diferentes Dosis de Biofertilizantes Líquidos (biol) sobre el Crecimiento de Mangle en Condiciones de Vivero,” Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral. p. 101.
Disponible en: http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/5338

35. JIMÉNEZ, M.I. 2008. “Effect of the nutritional status of banana (Musa spp.) on leaf disease infestation by Mycosphaerella fijiensis Morelet in Ecuador”. Doctoral Thesis. Leuven (BEL).

36. APARCANA S., JANSEN, A. 2008. “Estudio sobre el Valor Fertilizante de los Productos del Proceso ‘Fermentación Anaeróbica’ para Producción de Biogás,” German ProfEC GmbH , pp. 1-10.

37. CHÁVEZ, E., LEÓN, R., RUÍZ, O., AVEROS, C. & PERALTA, E. 2011. “Aplicación de biofertilizantes líquidos de producción local y su efecto en la rehabilitación de plantaciones de cacao fino y de aroma”. Memorias del I Congreso Binacional de Investigación en Ciencia y Tecnología de las Universidades del Norte del Perú y del Sur de Ecuador. Universidad Nacional de Piura-UNP. pp. 6

38. CHÁVEZ, E. 2009. “Determinación de la calidad de biofertilizantes líquidos y estudio del potencial para la inhibición *de Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones controladas y como alternativa en el manejo de sigatoka negra en sistemas de producción orgánica” Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral. p. 126. Disponible en: http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/11340

39. MAGDAMA, F., MARIDUEÑA, MG., VILLAVICENCIO M., PERALTA, E. 2011 “Bioles con propiedades fungicidas y su uso en el control de la moniliasis” Memorias del I Congreso Binacional de Investigación en Ciencia y Tecnología de las Universidades del Norte del Perú y del Sur de Ecuador. Universidad Nacional de Piura-UNP. pp.3

40. MAGDAMA, F. 2010. “Estudio del efecto de Bioles y cepas de Trichoderma sp. aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de Moniliophthora roreri, en condiciones in vitro,”. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral. p. 102. Disponible en: http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/11929

41. QUITO, D. 2009. “Estudio comparativo de dos biofertilizantes líquidos en condiciones in vitro e invernadero en plantas de banano y su efecto en el desarrollo de la Sigatoka Negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet)”. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral. p. 150. Disponible en: http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/13330

42. MURPHY, J., ZEHNDER, G., SCHUSTER, D., SIKORA, E., POLSTON, J., &KLOEPPER, J. 2000. “Plant Growth-Promoting Rhizobacterial Mediated Protection in Tomato Against Tomato mottle virus,” Plant Disease, vol. 84(7) pp. 779-784.

43. ZEHNDER, G., YAO., C, MURPHY, J., SIKORA, E., KLOEPPER, J. & SCHUSTER. D. 1999 “Microbe-induced resistance against pathogens and herbivores: evidence of effectiveness in agriculture,” Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture. Agrawal, A., Tuzun, S. & Bent, E., eds. American Phytopathological Society, St. Paul, pp. 335–355.

44. WANG, S. 2009. “Molecular Mechanism of Plant Growth Promotion and Induced Systemic Resistance to Tobacco Mosaic Virus by Bacillus spp.,” Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 19 (10) pp. 1250-1258.

45. WELKE, S. 1999. “Effectiveness of compost extracts as disease suppressants in fresh market crops in BC,” vol. 10. p. 12. Disponible en: http://www.ofrf. org/publications/Grant% 20reports/99.31.

46. MILÁN, J.J. 2011. "Determinación de la actividad *in vitro* de bioles locales sobre el desarrollo de las especies fitopatógenos ***Fusarium oxysporum*** y ***Fusarium solani***". Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral. p.68.

47. DIVER, S. 2002. “Notes on Compost Teas: A 2001 supplement to the ATTRA publication: Compost Teas for Plant Disease Control,” ATTRA publication, Fayetteville, AK, no. 800. P. 19.

48. SANTNER, A. CALDERON-VILLALOBOS, L., &ESTELLE, M. 2009. “Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth.” Nature Chemical Biology. vol. 5 pp. 301-307.

49. BARI R., JONES, J. 2009. “Role of plant hormones in plant defence responses.,” Plant molecular biology, vol. 69, no. 4, pp. 473-88.

50. BURNS, R. 2009. “Plant pathology: techniques and protocols”, vol. 54. Humana Press, p. 258.

51. SANCHEZ, L.R., SIRONI, J.S., CRESPO, J., PELLICER, C., LÓPEZ, M. 1998. “Crecimiento y absorción de nutrientes del melón bajo invernadero,” Investigación Agraria Producción Protección Vegetales, vol. 13, no. 1-2, pp. 111–120.

52. CIBA-GEIGY.1981. Manual para Ensayos de Campo en Protección Vegetal. Segunda edición, revisada y ampliada. División Agricultura, CIBA-GEIGY. Basilea, Suiza. p. 205.

53. DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

54. BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., CASANOVES F., DI RIENZO J.A., ROBLEDO C.W. 2008. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina. p. 336.

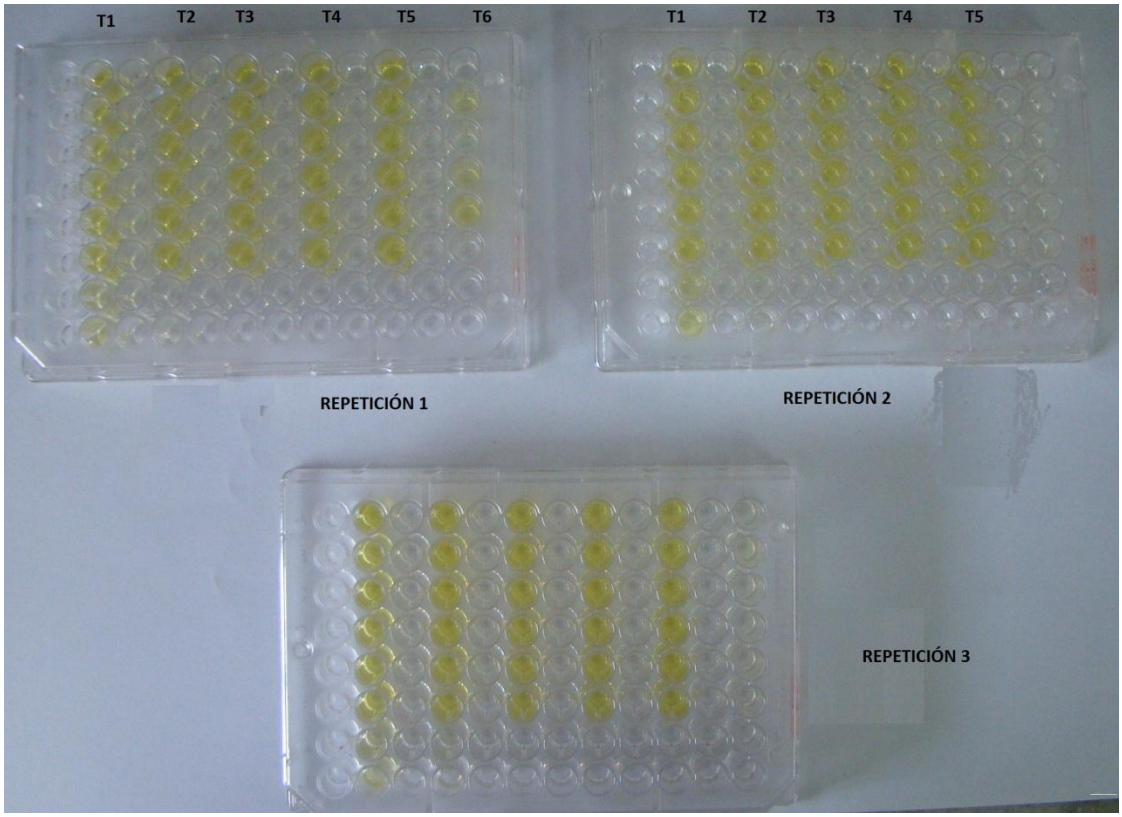
APÉNDICES

Apéndice A

Diagrama de elaboración de los bioles producción local.

Fuente: Chávez E. (Chávez 2009)

APÉNDICE B



Prueba serológica DAS-ELISA.

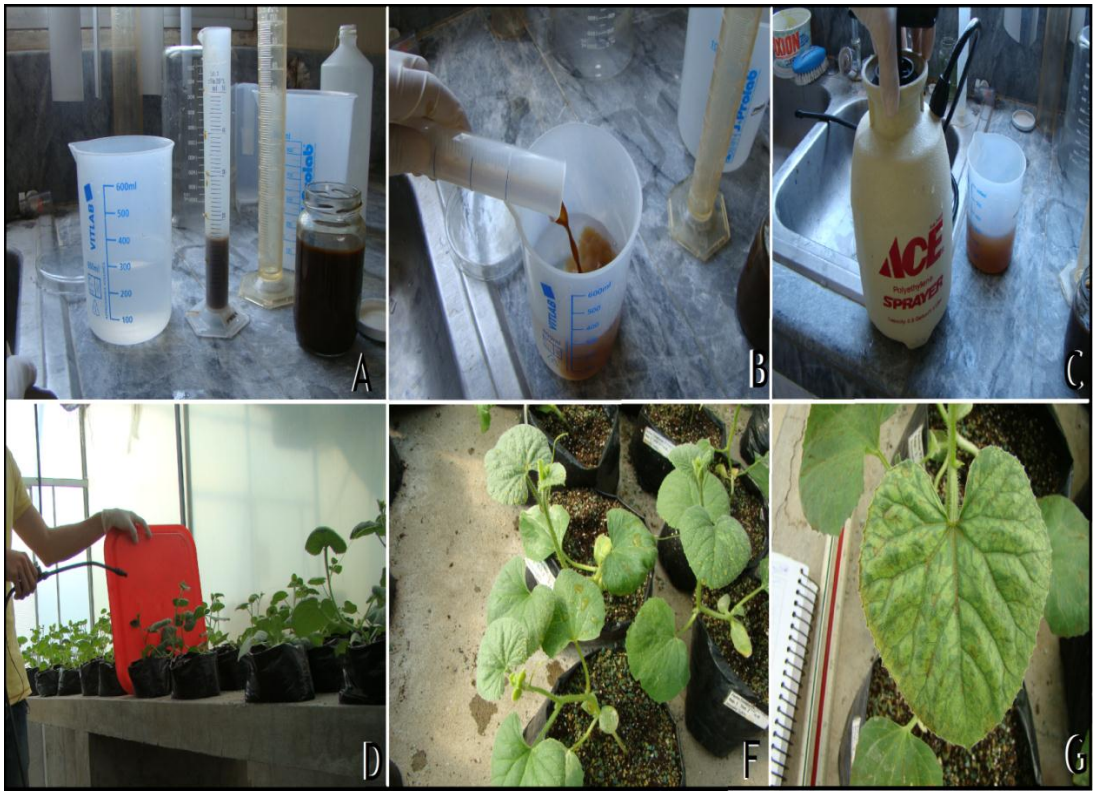
APÉNDICE C.

Inoculación de las unidades experimentales.

A. Recolección de muestras de plantas positivas para SqMV.
B. Lavado superficial.
C. Macerado de las muestras en un mortero estéril y refrigerado,
D. Materiales necesarios para la inoculación.
E. Jugo infectivo, bajo refrigeración
F. Unidades experimentales, antes de la inoculación.
G. Inoculación mecánica de las plantas de melón

APÉNDICE D.

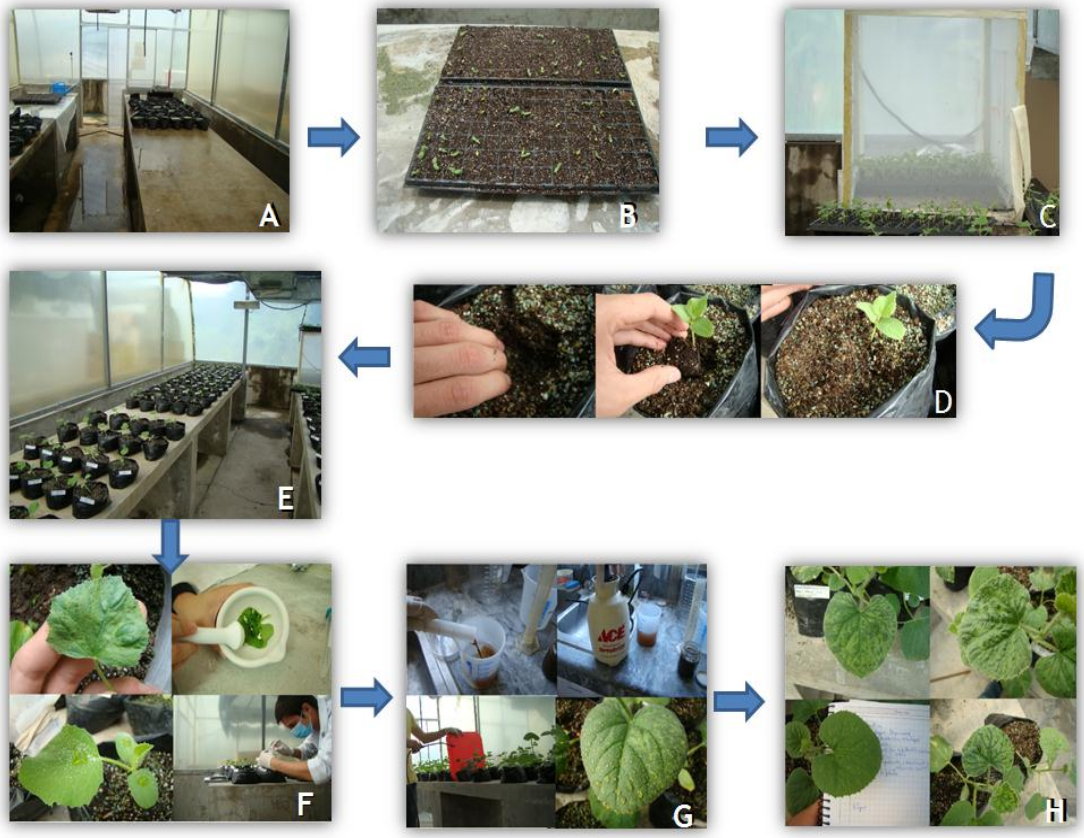
Aplicación foliar de biol, a los tratamientos.



A – C. Calibración de las diluciones necesarias, para cada tratamiento.
D. Aplicación foliar de biol, dirigida con una pantalla plástica.
E. Plantas después de la aplicación de biol
F. Plantas 7 días después de una aplicación de biol, A pesar que se observan rastros del biol, este no produjo fitotoxicidad

APÉNDICE E.

Diagrama del desarrollo del experimento.



A Desinfección de cubículo.
B Siembra en bandejas germinadoras con sustrato BM2.
C Protección de las plántulas, con mallas de nylon.
D Trasplante de plántulas a fundas con sustrato (1 L volumen)
E Unidades experimentales, listas para ser inoculadas.
F Inoculación de plántulas.
G Aplicación semanal de biol.
H Evaluación semanal de síntomas.