

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

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

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

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Presentado por:

Omar Oswaldo Olvera Vaca

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año – 2003

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

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

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

DEDICATORIA

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

TRIBUNAL DE GRADUACION

Ing. Francisco Andrade S.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Dr. Rodolfo Maribona H.
DIRECTOR DE TESIS

Ing. Daniel Navia M.
VOCAL

Ing. Andrés Brando. V.
VOCAL

DECLARACION EXPRESA

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

Omar Oswaldo Olvera Vaca

RESUMEN

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

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

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

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

El **objetivo general** de este trabajo ha sido:

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

Los objetivos específicos:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INDICE GENERAL

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

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

CAPITULO 3

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

CAPITULO 4

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

CAPITULO 5

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

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

CAPITULO 6

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

CAPITULO 7

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

| | |
|--|----|
| enfermas..... | 60 |
| 7.4 Descripción asintomática en la etapa de propagación..... | 60 |
| 7.5 Valores de crecimientos en la etapa de propagación..... | 61 |
| 7.6 Vitro plantas con síntomas precoz en el periodo de enraizamiento..... | 72 |
| 7.7 Plántulas con síntomas en la etapa de invernadero..... | 73 |
| 7.8 Síntomas de variación somaclonal..... | 74 |
| 7.9 Confirmación por microscopia electrónica..... | 74 |

CAPITULO 8

| | |
|---|------------|
| 8. CONCLUSIONES..... | 75 |
| 8.1 Plantas adulta de banano con síntomas foliares causado por el BSV..... | 75 |
| 8.2 Los efectos del estrés térmico, hídrico y hormonal en plántulas juveniles..... | 76 |
| 8.3 Plántulas con síntomas precoz de cultivo de tejido..... | 76 |
| 8.4 Comprobación de la partícula viral en las hojas de banano. | 77 |
| RECOMENDACIONES..... | 78 |
| ANEXOS..... | 79 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 114 |

ABREVIATURAS

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

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Descripción esquemática de una infección viral del BSV en una célula vegetal..... | 9 |
| Figura 2 Síntomas típico del BSV..... | 14 |
| Figura 3 Síntomas locales del BSV en la fruta de banano..... | 15 |
| Figura 4 Síntoma de hospedero del BSV..... | 15 |
| Figura 5 La cochinilla que transmite el BSV..... | 16 |
| Figura 6 Partículas virales baciliformes del Virus del Rayado del Banano (BSV)..... | 28 |
| Figura 7 Esquema del proceso de los tratamientos in vitro | 41 |
| Figura 8 Distribución de los hijuelos con BSV antes de la introducción in vitro..... | 46 |
| Figura 9 Fases de la introducción in vitro | 47 |
| Figura10 Etapas del proceso de propagación | 47 |
| Figura 11 Diferentes concentraciones de PEG..... | 49 |
| Figura 12 Plántula en un medio normal de enraizamiento | 49 |
| Figura 13 Distribución de las plántulas en el invernadero..... | 50 |
| Figura 14 Metodología de la purificación del BSV..... | 52 |
| Figura 15 Síntomas típico de la enfermedad del BSV en la variedad | |

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

INDICE DE TABLAS

| | | |
|---------|---|----|
| Tabla 1 | Enfermedades abióticas o inducidas por estrés físico o Químico..... | 19 |
| Tabla 2 | Plantas eliminadas por El Virus del Rayado del Banano (BSV), en 13 periodos durante los años1992 – 1996(CIA. UBESA).Ecuador 2002..... | 21 |
| Tabla 3 | Incidencia (%) del Virus del Estriado del Banano (BSV) en Cultivares de banano en tres localidades .Ecuador 2002..... | 21 |
| Tabla 4 | Incidencia (%) del Virus del Estriado del Banano (BSV) en Cultivares plátano en tres localidades. Ecuador 2002..... | 22 |
| Tabla 5 | Número de plantas con síntomas BSV evaluadas en cuatro localidades de la Provincia de Los Rios por Reyes, W en 1997..... | 22 |
| Tabla 6 | Genotipos infectado por el BSV en Australia .1992..... | 27 |
| Tabla 7 | Las principales pruebas serológicas de aplicación para el diagnostico de los virus | 33 |
| Tabla 8 | El efecto de la infección con el BSV sobre el desarrollo de las plantas, rendimiento y calidad de fruta, Australia 1996. | 35 |
| Tabla 9 | Preparación de medios de cultivo de banano en la etapa | |

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

INDICE DE ANEXOS

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

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

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