

CAPITULO 5

5. MATERIALES Y METODOS

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

5.1 Etapas del proceso de desarrollo de la investigación

La investigación tuvo tres etapas:

Etapas 1.- Recolección del material en el campo.

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

Etapas 2. Propagación del material vegetativo en laboratorio.

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

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

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

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

- Se preparó un medio de cultivo común para los pases de subcultivo para obtener las plántulas requeridas.
- Los tratamientos que se utilizaron fueron diferentes concentraciones de hormona 6-bencilaminopurina (BAP), polietilén glicol (PEG) en los medios de cultivo a temperatura de 18° C, 26° C y 18° C a 34° C de manera individual, de los cuales se utilizó 840 plántulas, como se indica la figura 7.

Fase 2. Propagación de plántulas in vitro en cantidades suficientes

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

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

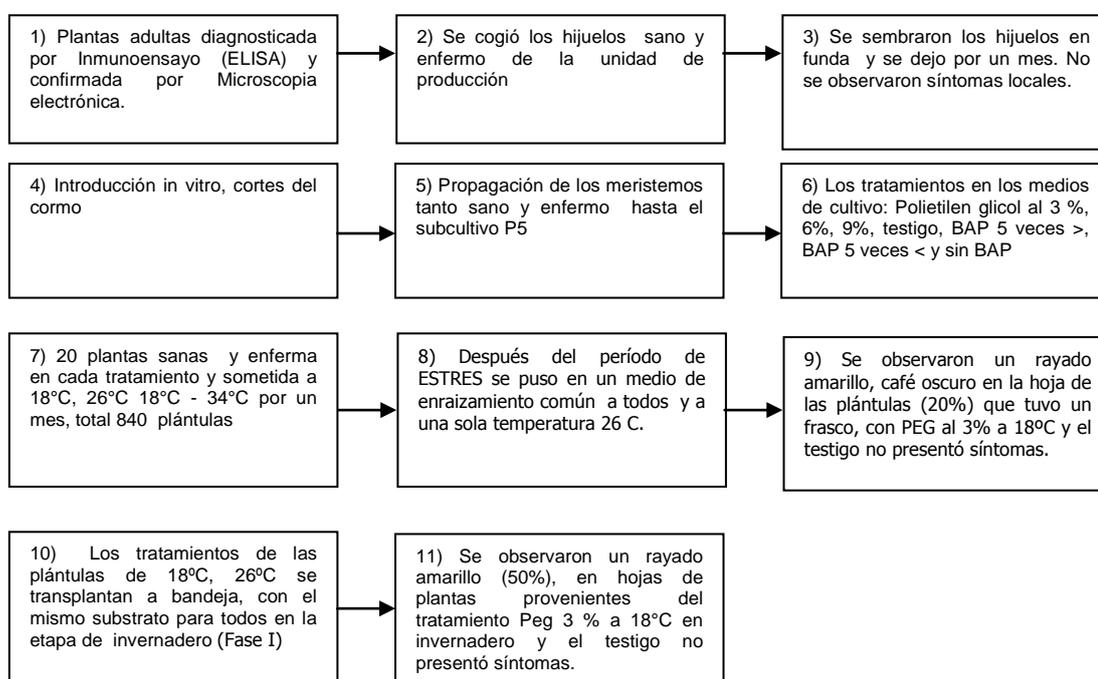


Figura 7. Esquema del proceso de los tratamientos in Vitro

Etapa 3 . Confirmación e identificación de la presencia viral .

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

5.2 Preparación de medios de cultivos de banano

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

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

TABLA # 9

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE BANANO

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

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

5. 2.1 Tratamientos correspondientes a la investigación.

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

TABLA #10

DISTRIBUCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y TEMPERATURA DEL EXPERIMENTO.

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

5.2.2 Preparación de los medio de cultivo con BAP (6 bencilaminopurina)

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

TABLA # 11

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

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

5.2.3 Preparación de los medios con PEG (Polietilen glicol)

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

TABLA # 12

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

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

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

TABLA # 13

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

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

5.3 Propagación in vitro de plantas sanas e infectadas.

5.3.1 Explantación

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

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



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

5.3.2 Introducción in vitro

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

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

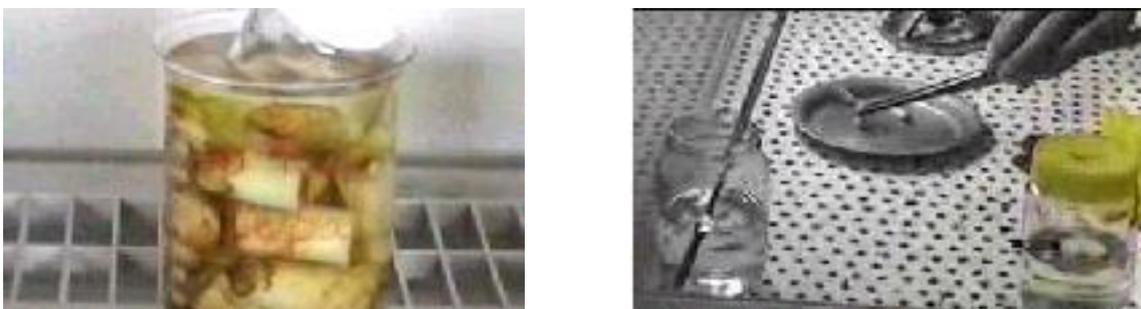


Figura 9. - Fases de la introducción In Vitro: a) primer corte en el ápice meristemático b.) tercer corte para la siembra en los tubos de ensayo

5.3.3 Propagación.

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



Figura a)



Figura b)



Fig. c)

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

5.3.4 Periodo de estrés

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

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

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

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

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



Fig a)

Fig b)

Fig c)

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

5.3.5 Periodo de enraizamiento

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



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

5.3.6 Periodo de adaptación e invernadero

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



Fig a)



Fig b)

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

5.4 Toma de las muestras foliar para la purificación.

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

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

5.5 Obtención y purificación del virus para el diagnóstico.

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

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

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

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

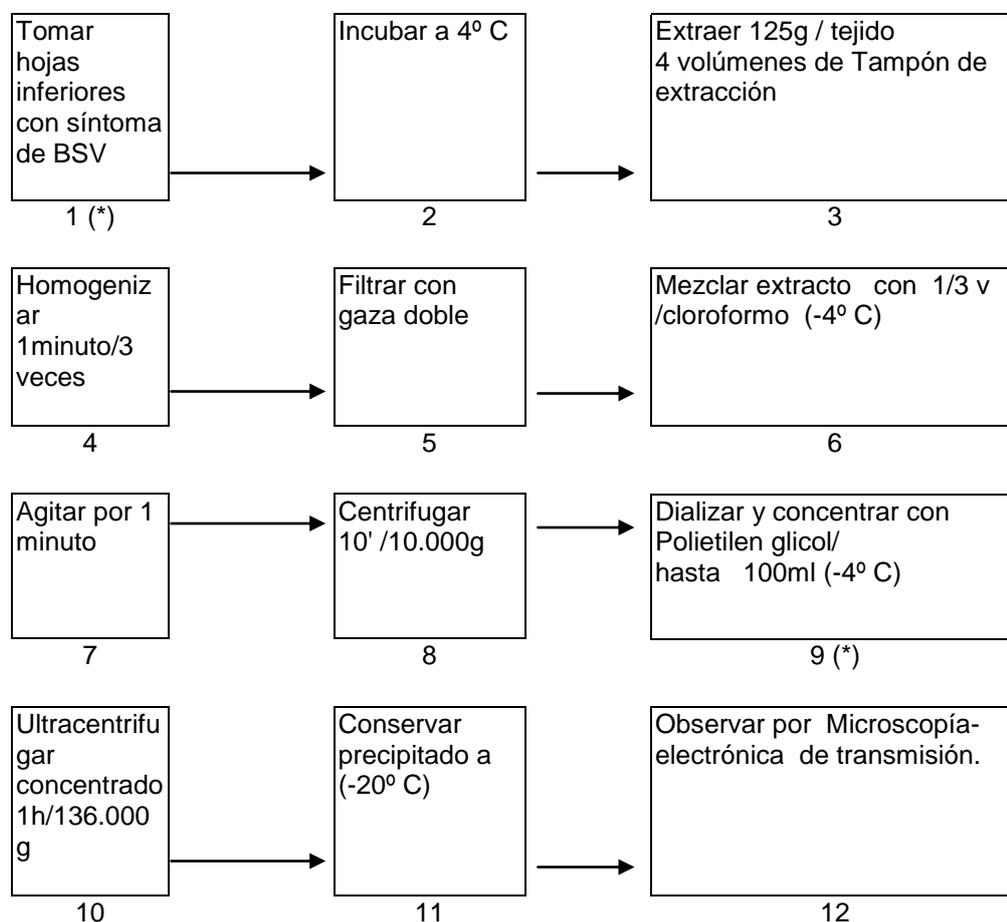


Figura 14.- Metodología de la purificación del virus del rayado del banano (BSV) según descrito por LOCKHART B (1986), con ciertas modificaciones (*)

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

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

CAPITULO 6

6. ANALISIS ESTADISTICO

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

6.1 Los factores en estudios.

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

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

6.2 Interacciones presentes.

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

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

- Medio ejecutivo por tipo de planta por temperatura de crecimiento

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

6.3 Tratamientos en estudio

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

TABLA # 14

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

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

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

Esquema del análisis estadístico.

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

6.4 Análisis funcional

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

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

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

CAPITULO 7

7. RESULTADOS Y DISCUSION

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

7.1 Descripción de las plantas adulta con síntomas.

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



Fig. a)



Fig. b)

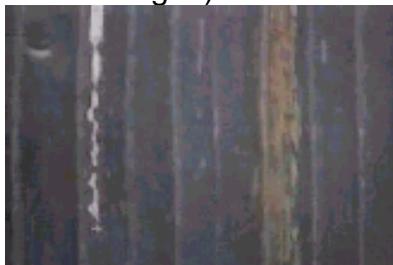


Fig. c)



Fig. d)

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

7.2 Descripción de los síntomas atípicos.

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



Fig a)



Fig b)

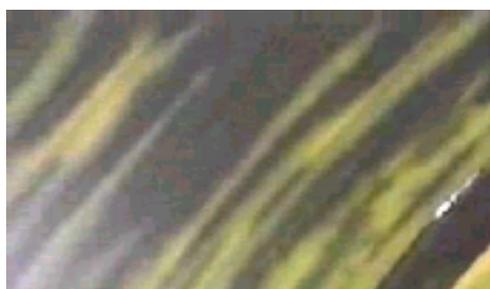


Fig c)

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

7.3 Evaluación de síntomas en hijuelos de plantas madres enfermas

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



Figura 17. Los hijuelos en estado asintomático

7.4 Descripción asintomático en la etapa de propagación.

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



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

7.5 Valores de crecimientos en la etapa de propagación .

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

Área foliar

- **Período de estrés**

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

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

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

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

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

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

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

- **Periodo de Enraizamiento**

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

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

- **Período de adaptación**

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

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

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

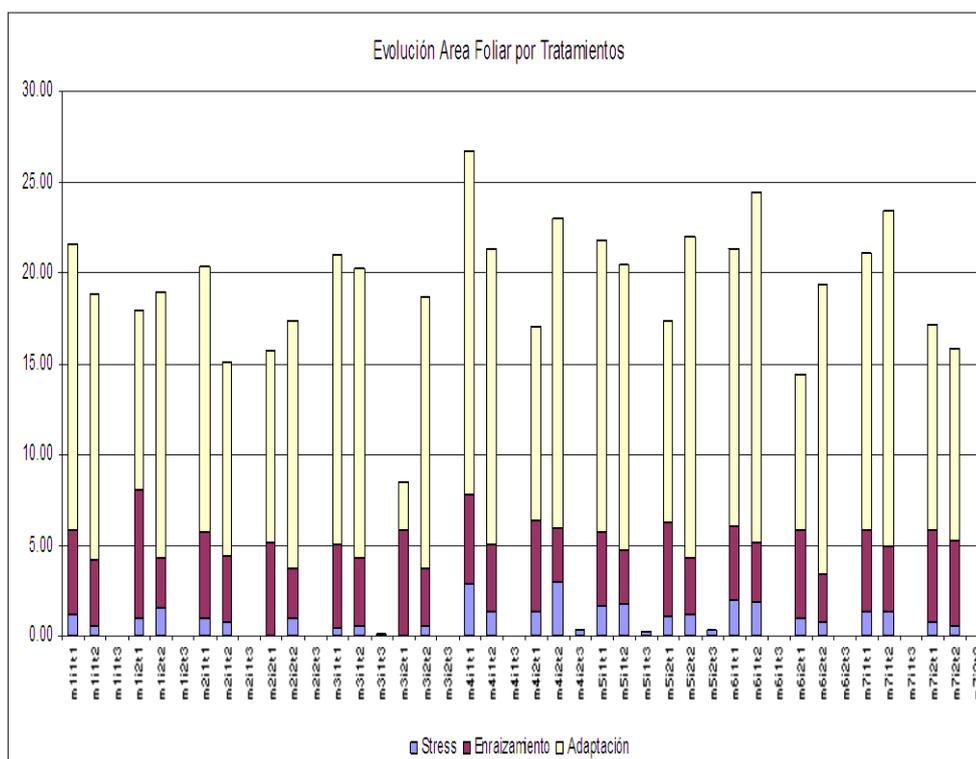


Figura 19.- Evaluación del área foliar en los diferentes períodos de crecimiento.

Altura

- **Periodo de estrés**

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

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

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

- **Periodo de enraizamiento**

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

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

- **Periodo de adaptación**

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

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

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

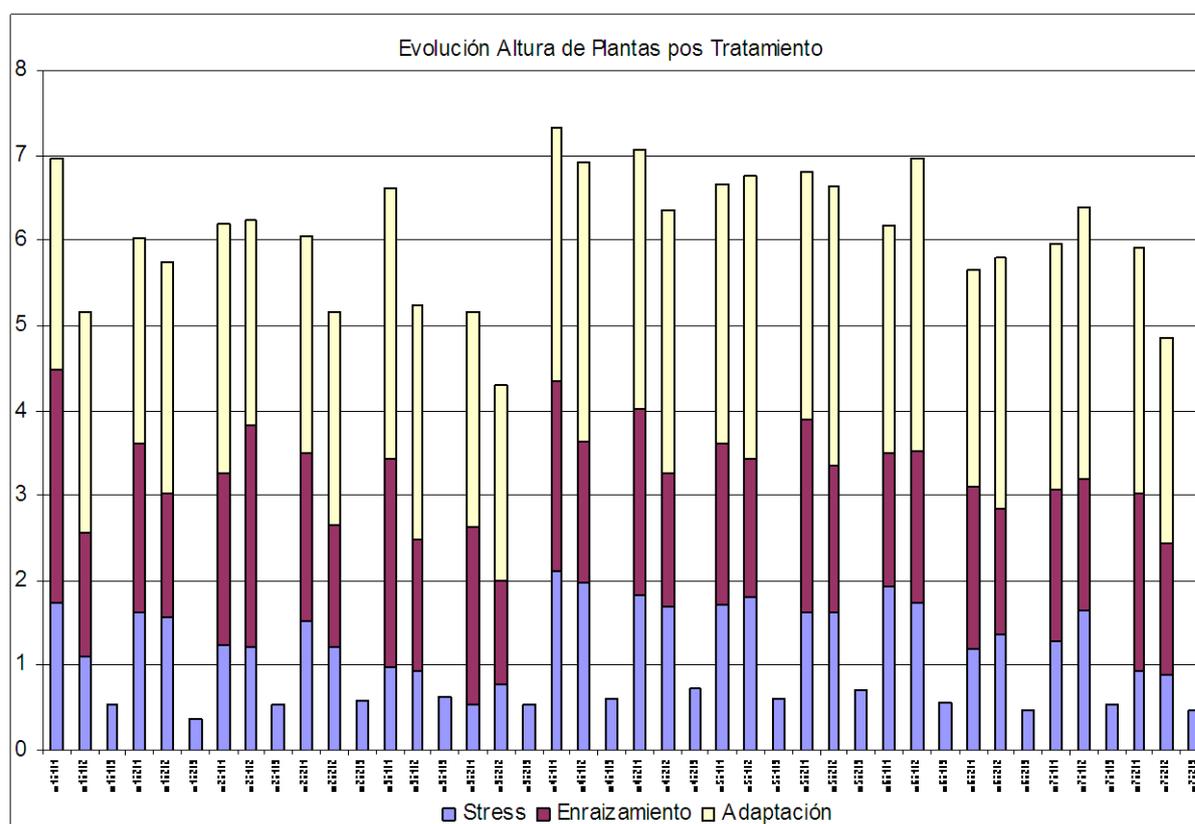


Figura 20.- Crecimiento de altura de las plantas por los tratamientos en los diferentes períodos

Peso

- **Periodo de estrés**

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

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

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

- **Periodo de enraizamiento.**

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

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

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

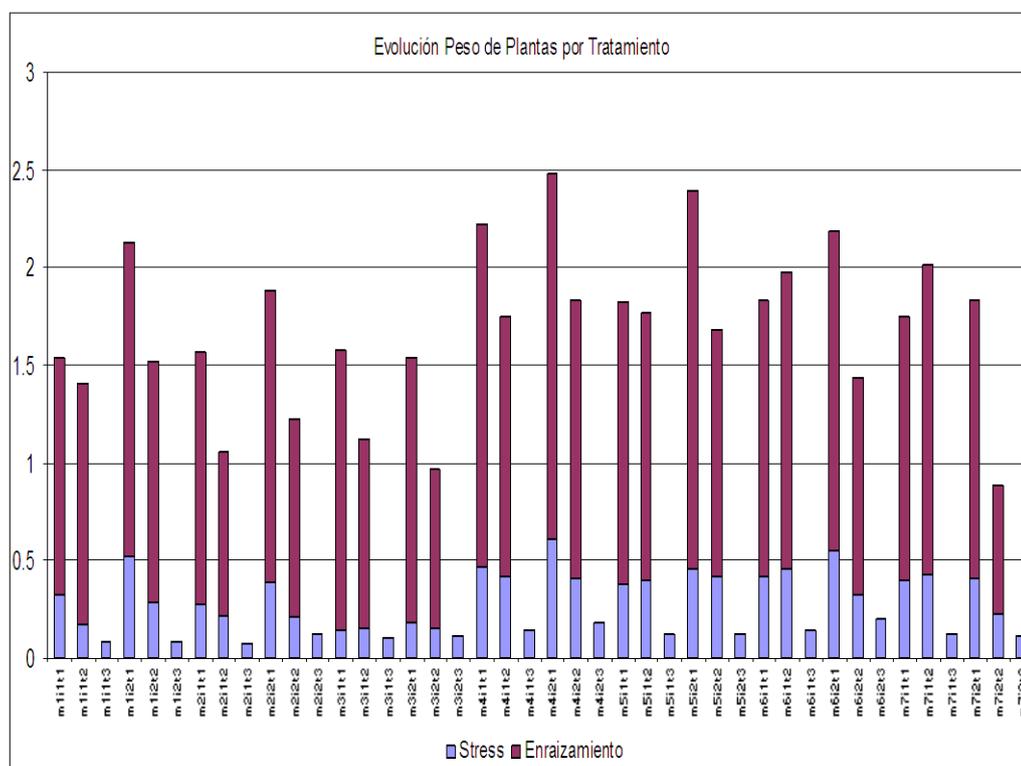


Figura 21. Datos de crecimiento de peso de plantas por los tratamientos en los diferentes periodos

Crecimiento radicular

Periodo de estrés.

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

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

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

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

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

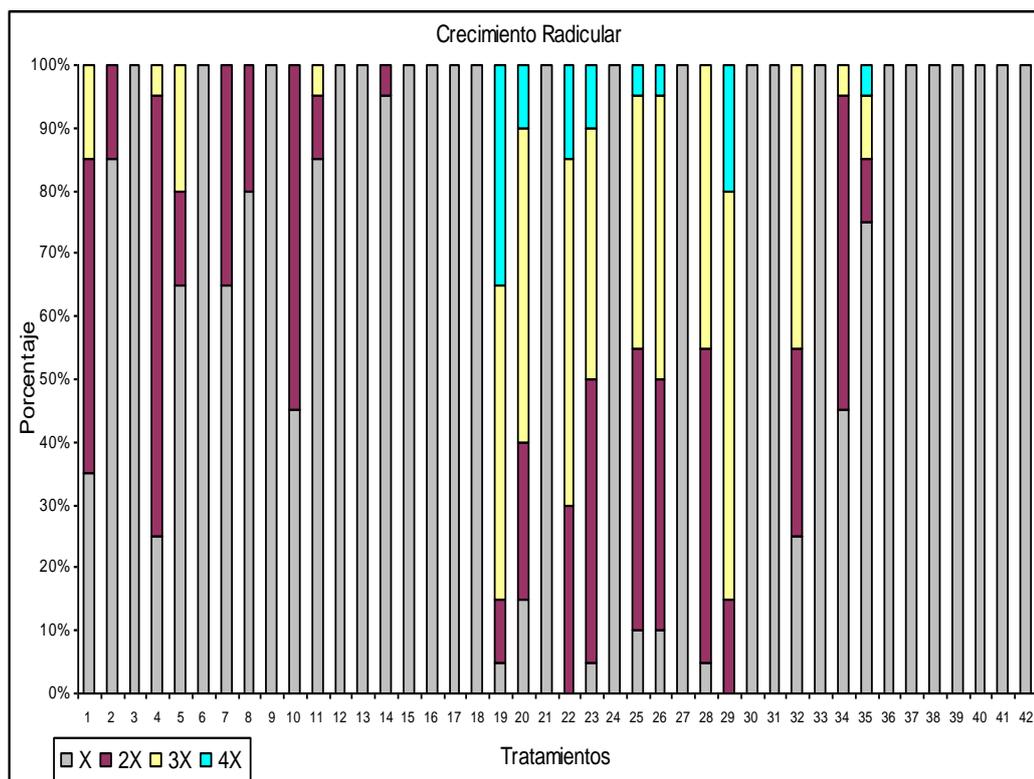


Figura 22.- Distribución del crecimiento radicular por los tratamientos en el período de estrés:

- Periodo de enraizamiento

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

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

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

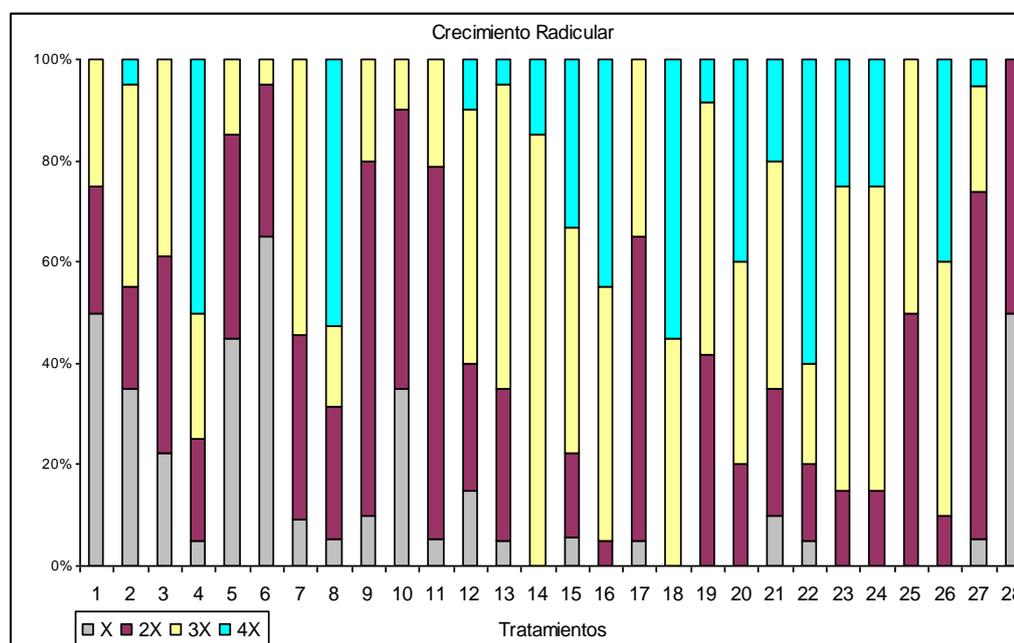


Figura 23. Distribución del crecimiento radicular por los tratamientos en el período de enraizamiento.

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

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



Fig a)



Fig b)

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

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



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

7.7 Plántulas con síntomas en la etapa de invernadero

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



Fig a)



Fig b)

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

7.8 Síntomas de variación somaclonal

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



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

7.9 Confirmación por microscopía electrónica.

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



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

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

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

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

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

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

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

8.3 Plántulas con síntoma precoz de cultivo de tejido.

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

8.4 Comprobación de la partícula viral en las hojas de banano

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

RECOMENDACIONES

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

ANEXOS