# ESCUELA SUPERIOR POLITENICA DEL LITORAL

## Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción.

"Determinación de los efectos de productos comerciales obtenidos a base de cítricos y de neem para el manejo de sigatoka negra y su agente causal (*mycosphaerella fijiensis morelet*)"

## TESIS DE GRADO

Previo la obtención del Título de:

## INGENIERO AGROPECUARIO

Presentada por:

Ronald Eduardo León Aroca

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2009

# AGRADECIMIENTO

A Dios por guiarme en el camino correcto y llenarme de bendiciones. A mis Padres, Hermana, Esposa e Hijo por su apoyo, paciencia, cariño, y sobre todo por el amor que me han brindado durante todo este camino. A la Doctora María Isabel Jiménez Ph.D., directora de la tesis por su invaluable ayuda. Al CIBE por su apoyo total en la realización de la tesis. A mis maestros por su disposición y ayuda brindadas. A mis amigos y compañeros por su ayuda y continuo aliento.

## DEDICATORIA

A MIS PADRES,

A MI HERMANA,

A MI ESPOSA,

A MI HIJO,

A MIS AMIGOS

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Francisco Andrade S.
DECANO FIMCP
PRESIDENTE

Ph.D. María Isabel Jiménez F.
DIRECTORA DE TESIS

M.Sc. Edwin Jiménez R.
VOCAL

CIB-ESPOL

# DECLARACIÓN EXPRESA

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

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Ronald León Aroca

# RESUMEN

La forma más común de combatir a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es el uso de fungicidas químicos, lo que ocasiona problemas de contaminación ambiental, resistencia por parte del organismo causante de la enfermedad y malformaciones e intoxicación en humanos y animales.

El objetivo principal de esta investigación es determinar el potencial de productos alternativos de origen vegetal para el manejo de la Sigatoka negra, mediante la evaluación de productos a base de extractos de cítricos y neem en medios de cultivo necesarios para el desarrollo del patógeno.

La toma de datos se realizó, en evaluación de la germinación de ascosporas (crecimiento del tubo germinativo), biomasa hifal (peso del micelio) y diámetro de colonias en medios sólidos y líquidos en condiciones controladas.

Para validar la hipótesis que los productos comerciales a base de extractos de cítricos y Neem tienen un efecto directo fungicida o fungistático sobre el desarrollo de *M. fijiensis* y alcanzar los objetivos propuestos se utilizó un modelo experimental diseño completamente al azar (DCA) donde los tratamientos son: 0.1; 0.3; 0.5; 1; 3; 5; 10; 30 ppm, además de establecer un

control absoluto, en el análisis de estos datos se utilizó un ANOVA de dos colas, así como la prueba de significancia de Tukey y medidas de tendencia central que determina la diferencia entre los tratamientos. Para la obtención de los datos de los ensayos estudiados se utilizaron tablas Probit y en la estimación de la dosis letal media (DL50) se utilizó el método de regresión lineal simple.

Tanto los productos a base de extractos de neem como los de extractos de cítricos tuvieron mayor efecto a mayor concentración tanto el uno como el otro, el efecto de los productos a base de extractos de neem y extractos de cítricos inhiben a *M. fijiensis* directamente proporcional.

La dosis letal media (DL50) del extracto de neem es de 1.03 ppm por el método de filtración y en el extracto de cítricos la dosis letal media (DL50) se encuentra entre las dosis 0.1 y 0.3ppm.

Se recomienda realizar ensayos con el hospedero en condiciones semicontroladas (invernadero) tomando en cuenta la dosis letal media (DL50), con el extracto de neem ensayos tomando en cuenta la dosis letal media (DL50)

Validar en campo los resultados obtenidos bajo condiciones semicontroladas (invernadero) utilizando las concentraciones que tuvieron buenos resultados

y realizar ensayos en el campo en zonas geográficas que presenten alta humedad relativa y  temperatura elevada.

# ÍNDICE GENERAL

Pág.

RESUMEN……...II

ÍNDICE GENERAL……V

ÍNDICE DE TABLAS…..……VIII

ÍNDICE DE GRÁFICOS……...IX

INTRODUCCIÓN…...……..……..…..1

CAPÍTULO 1.

1. INTRODUCCION..……2

1.1. Antecedentes……...6

1.2. Justificación……7

1.3. Hipótesis…….....8

1.4. Objetivos……..……....9

1.4.1. Objetivo general……..……...9

1.4.2. Objetivos específicos…….9

CAPÍTULO 2.

2. REVISIÓN DE LITERATURA……10

2.1. Relación Musa-Sigatoka negra……..12

2.1.1. Interacción planta-patógeno……17

2.1.2. Mecanismos de resistencia de las enfermedades……..19

CAPÍTULO 3.

3. MANEJO DE LA ENFERMEDAD……31

3.1. Control genético……..……..31

3.2. Control biológico….……....33

3.3. Control cultural.……34

3.4. Control químico……37

CAPÍTULO 4.

4. PRODUCTOS A BASE DE EXTRACTOS DE PLANTAS

4.1. Antecedentes de los extractos de plantas……44

4.2. Propiedades y características ……46

4.3. Los extractos en el control de enfermedades……..48

4.4. Extractos de Cítricos ……...49

4.5. Extractos de Neem……...50

CAPÍTULO 5.

5. MATERIALES Y MÉTODOS…….……..53

CAPÍTULO 6.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN……65

CAPÍTULO 7.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……84

APÉNDICE

BIBLIOGRAFÍA

# ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 5.1. Producto Extracto de Cítricos (EC) con dosis utilizadas en los ensayos en la esterilización al calor (autoclave) y al frío (filtración)……..56
Tabla 5.2. Producto Extracto de Neem (EN) con dosis utilizadas en los ensayos en la esterilización al calor (autoclave) y al frío (filtración)……..56
Tabla 6.3. Efecto del extracto de cítricos, esterilizado por autoclave, sobre el diámetro de colonias (mm) en evaluaciones realizadas a los 7 y 15 días……..72

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

Pág.


Gráfico 2.1. Distribución mundial de *M. fijiensis y M. musicola* en el mundo……...15
Gráfico 2.2. Ciclo sexual y asexual de *M.fijiensis*……16
Gráfico 2.3. Estadíos del crecimiento de *M. fijiensis* ……17
Gráfico 6.1.1. Crecimiento del tubo germinativo del hongo en medio sólido en el ensayo con el extracto de cítricos por filtración……..66
Gráfico 6.1.2 Crecimiento del tubo germinativo del hongo en medio sólido en el ensayo con el extracto de neem por filtración……67
Gráfico 6.2.1. Peso del micelio (g) evaluado a los 20 días ante la presencia de diferentes dosis con el extracto de cítricos por autoclave……68
Gráfico 6.2.2. Peso del micelio (g) evaluado a los 20 días ante la presencia de diferentes dosis con el extracto de cítricos por filtración……69
Gráfico 6.2.3. Peso del micelio (g) evaluado a los 20 días ante la presencia de diferentes dosis con el extracto de Neem por autoclave……...70
Gráfico 6.2.4. Peso del micelio (g) evaluado a los 20 días ante la presencia de diferentes dosis con el extracto de Neem por esterilización……71
Gráfico 6.3.1. Análisis de la relación entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo natural de las dosis con el extractos cítricos por autoclave……73
Gráfico 6.3.2. Análisis de la relación entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo natural de la dosis con el extractos cítricos por filtración……...74
Gráfico 6.3.3. Efecto del extracto de Neem, esterilizado por autoclave, sobre el diámetro de colonias (mm) en evaluaciones realizadas a los 7 y 15 días……75

Gráfico 6.3.4. Análisis de la relación entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo natural de la dosis con el extracto de Neem por autoclave……..76
Gráfico 6.3.5. Efecto del extracto de Neem, esterilizado por filtración, sobre el diámetro de colonias (mm) en evaluaciones realizadas a los 7 y 15 días……77
Gráfico 6.3.6. Análisis de la relación entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo natural de la dosis con el extracto de Neem por filtración……78
Grafico 6.3.7 Efecto de los extractos de cítricos y neem, esterelizado por autoclave, sobre el diámetro de colonias (mm) en evaluaciones realizas a los 15 días……79

# INTRODUCCION

El banano es una monocotiledónea del género *Musa spp.* Originaria del sureste de Asia, desde donde se extendió a diferentes partes del mundo como consecuencia de la migración del hombre [66].

El cultivo del banano es uno de los más importantes a nivel mundial, por ser el alimento básico de millones de personas en los países tropicales en vías de desarrollo y constituye una importante fuente de ingreso para los mercados locales e internacionales [43].

El banano, junto con el arroz, trigo y maíz, se encuentra entre los cultivos de mayor importancia para la seguridad alimentaria a nivel mundial. En el Ecuador, existen alrededor de 180.000 hectáreas dedicadas al cultivo de banano y plátano, productos que son en su mayoría exportados [65].

En el 2007 la exportación de banano contribuyó con el 55% de los ingresos totales de las exportaciones tradicionales [65]. Sin embargo, estos cultivos se han visto directamente afectados por la enfermedad denominada Sigatoka negra causada por el hongo *M. fijiensis.*

La Sigatoka negra es una enfermedad de tipo foliar que causa daños severos y directos al tejido fotosintético del banano y además indirectamente provoca

la maduración prematura de la fruta, obteniendo así pérdidas que pueden registrar desde un 30 a 100% en la producción final [25,94].

Reportada en Honduras en 1972, luego se diseminó por todo el continente americano, siendo su principal medio de diseminación el transporte de material infectado sobre todo de un continente al otro, además se disemina por medio del viento y la lluvia que lleva sus esporas a nivel local entre las diferentes regiones de los países productores.

Existen métodos de control de la enfermedad, como el legal, físico, cultural, biológico, y químico; siendo este último el más utilizado en la actividad bananera. Sin embargo, este método es muy cuestionado ya que los problemas de resistencia a las moléculas utilizadas, está en incremento, por tal motivo la eficiencia de esta alternativa de control cada vez es menor.

Actualmente, los sistemas de producción tienden a ser ecológicos, integrados, utilizando métodos racionales, basados en insecticidas y fungicidas más selectivos, de origen vegetal, los cuales están en armonía con el ambiente. Las especies de plantas representan un potencial para disminuir el uso de agroquímicos, que no solo atentan contra la ecología y la salud, sino que además, permanecen en el medio por años [24].

El campo de la investigación se encuentra en constante avance, en lo que respecta a la búsqueda de nuevas sustancias con propiedades inhibitorias de patógenos, debido a la contaminación ambiental producida por el uso de agroquímico. Asociado a esto, los problemas de resistencia de estos microorganismos y la necesidad de los productores de competir en el mercado nacional e internacional con materiales sin residuos tóxicos, perfilan como una alternativa promisoria el desarrollo y uso de fungicidas botánicos para el control de Sigatoka Negra [73].

Por esta razón, el objetivo principal de este estudio hace referencia a la determinación del potencial de productos alternativos para el manejo del control de la Sigatoka Negra. Así mismo, se debe complementar esta opción con la aplicación de técnicas biológicas, lo que repercutirá favorablemente en los estudios epidemiológicos y en la definición de estrategias de control de la enfermedad, que sin duda estarán basadas en un manejo integrado amigable de los diferentes métodos.

# CAPÍTULO 1

## 1. GENERALIDADES

Las manchas de las hojas de los bananos y plátanos causadas por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra o raya negra y por *Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder, el agente causal de la Sigatoka, pueden considerarse desde el punto de vista económico las dos enfermedades más serias del género *Musa*.

Ambos patógenos atacan las hojas dando lugar a necrosis, a la disminución del tejido con actividad fotosintética y de los rendimientos brutos. Causan además la madurez prematura de los frutos, lo cual representa pérdidas importantes del rendimiento neto exportable [135].

Los costos de producción en las áreas de Sigatoka negra han aumentado en más de cuatro veces en relación con los de Sigatoka amarilla. En el Ecuador existen más de 200.000 Ha de banano

ubicadas principalmente en la región Litoral o Costa, particularmente en las provincias de Los Ríos (45.000 Ha), Guayas (43.000 Ha) y El Oro (44.000 Ha); unas con alta tecnología y otras de mediana a baja tecnologías [61].

La variabilidad del clima ha hecho que la Sigatoka negra tenga un comportamiento diverso, por lo que la enfermedad ha sido más severa en las plantaciones comerciales de la provincia de Los Ríos, en la de El Oro. Después de la presencia de la corriente de El Niño en el Ecuador en el año 1998, la Sigatoka negra incrementó su severidad y como consecuencia de ello, muchos programas de control de la enfermedad fracasaron; las bananeras virtualmente se quemaron, perdiéndose mucha fruta para la exportación, con consecuencias económicas graves para la economía de los productores [44].

A diferencia de otros países exportadores de banano, la producción bananera en el Ecuador no está en manos de las empresas multinacionales, el 80% de la producción proviene de los productores.

La industria bananera ecuatoriana genera en promedio 20 millones de dólares semanales siendo el soporte directo de más de 200.000 personas, constituyéndose como una fuente de trabajo y de ingresos

para miles de familias tanto del campo como de la ciudad, que laboran en las diferentes actividades, que van desde la siembra, el manejo y control fitosanitario de las plantaciones, llegando al corte y traslado de la fruta a las empacadoras [98].

## 1.1. Antecedentes

La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) es la enfermedad más importante que afecta la producción comercial de bananos y plátanos (*Musa spp.)* en la mayoría de las regiones productoras del mundo [85,134]. La enfermedad es originaria del sudeste asiático y en el continente americano, se identificó por primera vez en Honduras en el año de 1972 [136], desde donde se diseminó a todos los países bananeros de América Central, América del Sur, América del Norte y algunas islas del Caribe [84,136].

La Sigatoka negra ha ocasionado graves pérdidas en la producción comercial de bananos y ha modificado el manejo de las plantaciones, principalmente los programas de control químico. Esto ha traído como consecuencia un incremento en los costos de producción del cultivo. En la actualidad, el combate de la Sigatoka negra en bananos depende

principalmente de la aplicación continua de fungicidas [84,85,101], con las consecuencias fuertemente documentadas, como es el caso de pérdida de sensibilidad de *M. fijiensis* a diversos grupos químicos [84], contaminación ambiental y residuos en frutos [57]. Esta situación, hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas amigables con el medio ambiente.

## 1.2. Justificación

La *M. fijiensis* es una enfermedad capaz de producir una mayor cantidad de ascosporas, formas sexuales de reproducción y su esporulación por el envés de la hoja crea un patrón de infección a lo largo de la nervadura central que dificulta su control.

El tema propuesto se enmarca dentro del ámbito de la sanidad vegetal. Actualmente, los sistemas de producción tienden a ser ecológicos integrados, utilizando métodos racionales, basados en insecticidas y fungicidas más selectivos, de origen vegetal, los cuales están en armonía con el ambiente.

El control químico está basado en aplicaciones de fungicidas protectantes y sistémicos. Sin embargo, la aplicación frecuente

de estos fungicidas ha ocasionado la pérdida de sensibilidad del patógeno.

Por lo anterior mencionado, las especies de plantas representan un potencial para disminuir el uso de agroquímicos, que no solo atentan contra la ecología y la salud, sino que además, permanecen en el ambiente por años [24].

Los problemas de resistencia de estos microorganismos y la necesidad de los productores de competir en el mercado nacional e internacional con materiales sin residuos tóxicos, perfilan como una alternativa promisoria el desarrollo y uso de fungicidas botánicos para el control de Sigatoka negra en el cultivo de banano [73]. Por esta razón, el objetivo de esta investigación hace referencia a la evaluación de extractos vegetales sobre el control de Sigatoka negra.

## 1.3. Hipótesis

Los productos comerciales a base de extractos de cítricos y Neem tienen un efecto directo fungicida o fungistático sobre el desarrollo de *M. fijiensis*

## 1.4. Objetivos

### 1.4.1. Objetivo general

- Determinar el potencial de productos alternativos de origen vegetal para el manejo del control de la Sigatoka negra

### 1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar el potencial de las diferentes dosis utilizadas de los extractos de cítricos y neem sobre ascosporas, peso del micelio y diámetro de las colonias de *M. fijiensis*
- Determinar la actividad fungicida y fungistática de los productos comerciales en estudio.

# CAPÍTULO 2

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### El cultivo de banano: Origen y distribución.

El banano se origina en el sudeste de Asia, en las junglas de Malasia, Indonesia, y Filipinas, y está distribuido desde África occidental hasta el Pacífico [59]. En Ecuador se encuentra distribuido en el litoral, bajo condiciones agroclimáticas diversas que favorecen la presencia y desarrollo de fitopatógenos que afectan el rendimiento y calidad de la fruta [141].

El banano pertenece al género Musa de la familia Musáceas, orden Gingiberales. El banano se considera una hierba gigante perenne; no posee tronco y en su lugar presenta vainas foliares que forman una estructura llamada pseudotallo, que puede llegar a medir 30 cm de diámetro y alcanzar los 7 m. de altura [75].

Como el resto de las monocotiledóneas, posee un sistema de raíces adventicio que se origina del rizoma. El sistema radical del cultivo de banano es débil. Las hojas son de color verde o amarillo verdoso, sus bordes lisos y sus nervaduras pinnadas. La planta llega a tener de 10 a 15 hojas funcionales durante la floración y de 5 a 10 durante la cosecha. Las flores están agrupadas en racimos de 10 a 20 y protegidas por brácteas de color púrpura [64].

**Importancia económica:**

El banano es el cuarto cultivo de mayor importancia a nivel mundial luego del trigo, el arroz y el maíz. Es la fruta de mayor exportación en términos de volumen y la segunda, luego de los cítricos, en términos de valor. La quinta parte de la producción mundial de este cultivo es comercializada internacionalmente.

La industria del banano representa una importante fuente de ingresos y empleo para los principales países exportadores de Latinoamérica, el Caribe, Asia y África. Los cuatro países que lideran las exportaciones son Ecuador, Costa Rica, Filipinas y Colombia, mientras que los mayores productores son India, Brasil, China, Ecuador, Filipinas, Indonesia, Costa Rica, México, Tailandia y Colombia [37].

La sanidad del cultivo de banano es una de las partes más importantes dentro de la cadena de producción; un mal manejo fitosanitario puede llegar a causar cuantiosas pérdidas económicas y un notable descenso en el rendimiento de la planta. La Sigatoka negra es la enfermedad de la planta de banano más limitante en el trópico Americano, y es causada por el hongo patógeno denominado *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cuyo ataque deteriora las hojas de la planta, reduce el rendimiento y la calidad de la producción [2].

## 2.1. Relación Musa-Sigatoka negra

### Sigatoka negra en el Ecuador:

En Ecuador se detectó la Sigatoka Negra por primera vez en 1987 en las haciendas Timbre, Flamingo y Victoria, localizadas en la provincia de Esmeraldas. La enfermedad se encuentra en todo el territorio e inclusive en pequeñas áreas cultivadas en las islas Galápagos [95,97].

La Sigatoka negra es el principal problema fitopatológico del cultivo de banano y plátano en América Latina, Asia y África. Esta es causada por el hongo ascomiceto *M. fijiensis*, que entre

sus características biológicas se encuentra una alta producción de ascosporas y un alto número de ciclos sexuales. Debido a esto, el patógeno tiene una elevada tasa de colonización de tejidos que le permite predominar sobre otras enfermedades foliares del banano menos agresivas [58].

Altera la fisiología de la planta, reduciendo su capacidad fotosintética al destruir el tejido foliar a través del desarrollo de manchas necróticas que afectan el desarrollo del racimo ocasionando considerables pérdidas en la producción. Causa severos daños en el follaje disminuyendo la respiración y la acción fotosintética de la planta. Como consecuencia hay una reducción del rendimiento entre un 50 y 100% y la maduración prematura de la fruta cosechada [8,62,128].

**Agente causal : *Mycosphaerella fijiensis***

El hongo ascomiceto *M. fijiensis* es el agente causal de la enfermedad conocida como Sigatoka Negra en banano y plátano. Es un organismo heterotálico con ciclos de reproducción sexual y asexual. El término heterotálico se refiere a una especie constituida por individuos autoestériles

(autoincompatibles), que para la reproducción sexual requieren la unión de gametos compatibles, sin considerar la presencia de ambos órganos reproductores, masculinos y femeninos, en el mismo individuo. Pero, puede también referirse a una especie en la cual los sexos se presentan en talos separados, de modo que para efectuar la reproducción sexual se requieren dos talos diferentes [26,65,91].

El hongo infecta principalmente a plantas de banano y plátano [26,65,137]. Otros hongos emparentados a *M. fijiensis*, como *M. musicola,* conocida por causar la enfermedad llamada Sigatoka amarilla, también es un patógeno importante para la producción bananera, y al igual que *M. fijiensis* se encuentra ampliamente distribuida en el mundo (Graf 2.1).

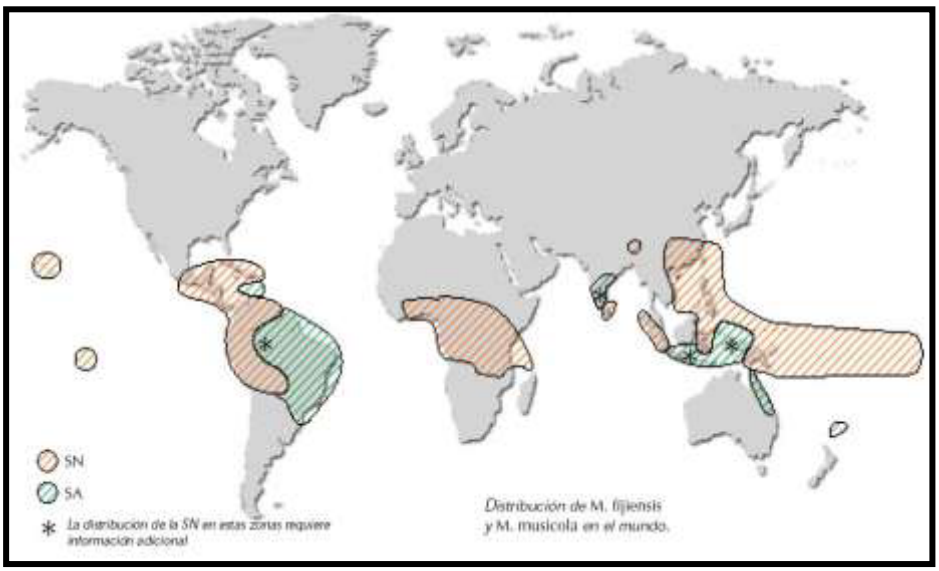


**Gráfico 2.1** Distribución mundial de *M. fijiensis y M. musicola* en el mundo.
SN= Sigatoka Negra, SA=Sigatoka Amarilla.
Elaborado por: Mourichon y Fullerton [96].

**Ciclo de *M. fijiensis* en banano**

*M. fijiensis* es el patógeno causante de la Sigatoka negra. Se reproduce tanto sexual como asexualmente. La fase de reproducción asexual se da a partir de las primeras lesiones de la enfermedad, donde se observa la presencia de conidióforos que salen de los estomas, principalmente, en el envés de las hojas (Graf 2.2) [7,46].

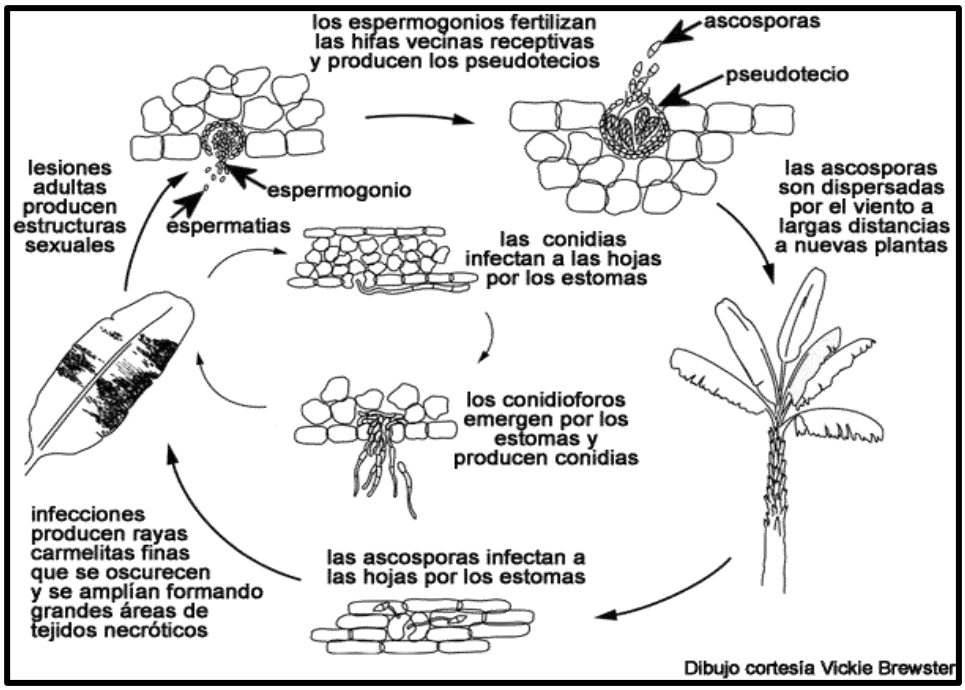


**Gráfico 2.2** Ciclo sexual y asexual de *M. fijiensis*
Elaborado por: La Sociedad Americana de Fitopatología [139].

La fase sexual es la más importante en la reproducción de la enfermedad, porque produce gran cantidad de ascosporas, que se desarrollan en cuerpos fructíferos llamados peritecios. Tanto las conidias como las ascosporas son las estructuras de diseminación de la enfermedad [7,46].

**Síntomas de la enfermedad**

Los primeros síntomas de la enfermedad de la Sigatoka negra son manchas cloróticas muy pequeñas que aparecen en la

superficie inferior de la tercera o cuarta hoja abierta. El color de las rayas va haciéndose más oscuro, algunas veces con un matiz púrpura, y visible en la superficie superior. Cuando el grado de severidad de la enfermedad es alto, grandes áreas de la hoja pueden ennegrecer como se puede observar en la (Graf 2.3) [14].

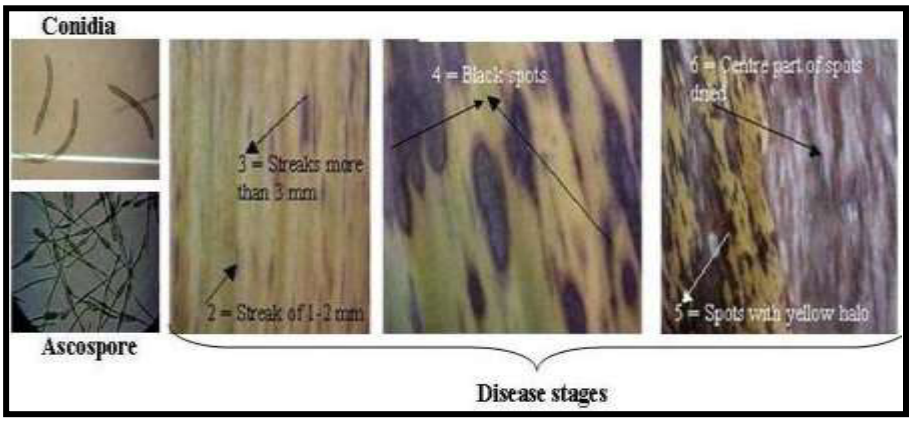


**Gráfico 2.3** Estadíos del crecimiento de *M. fijiensis*
Fuente: CIBE-ESPOL

### 2.1.1. Interacción planta-patógeno

Dentro de los ecosistemas naturales observamos que no se presenta esto, es debido al equilibro que existe [70].

Los síntomas de Sigatoka negra han sido identificados en especies como *Musa balbisiana*, muchas subespecies

de *M. acuminata* y clones banano comestibles [47]. El grado de severidad de los síntomas que se presente en las hojas por ataque de los hongos, serán dependientes de la compatibilidad que exista entre las especies de *Musa spp.* y el hongo [42].

Las plantas poseen varios mecanismos de defensa y los patógenos tienen maneras de evadir o suprimirlos, pero dependiendo de la constitución genética de ambos, la planta hospedera puede llegar a desarrollar otros mecanismos que le permitirán protegerse del ataque de un determinado patógeno [40,71].

Los genotipos de banano fueron agrupados en tres categorías para expresar su grado de resistencia a la Sigatoka: materiales altamente resistentes, que son los que presentan un bloqueo en la expresión de los síntomas y no permiten al hongo esporular; materiales parcialmente resistentes, que son los que muestran un lento desarrollo de los síntomas y los susceptibles, que se caracterizan por el rápido desarrollo de las lesiones necróticas en la hoja [42].

### 2.1.2. Mecanismos de resistencia de las enfermedades.

Las plantas superiores cuentan con varios mecanismos de defensa que son inducibles al ocurrir las interacciones planta-patógeno. Muchas de estas respuestas son el resultado de la activación en la transcripción de genes específicos [68].

Las muchas interacciones se pueden agrupar en cuatro clases que pueden estar o no relacionadas entre sí. Generalmente, se reconocen los siguientes:

a) Respuestas de defensas tempranas e inmediatas: reconocimiento y señalización intracelular.
b) Respuestas locales de defensa.
c) Respuestas sistemáticas de defensa.
d) Promoción de crecimiento: está asociado al sistema de defensa pero su aporte a los otros mecanismos no es tan claro aún.

a) *Respuestas de defensas tempranas e inmediatas: Reconocimiento y señalización intracelular*

Estas respuestas de defensa se conocen como una primera línea de defensa debido a la reacción rápida y a su correlación de la inducción subsecuente de otras respuestas de defensa. Algunas de las respuestas que ocurren es el cambio de flujos iónicos (H+, K+, Cl-, Ca2+) a través de la membrana plasmática y la formación de $H_2O_2$ tan pronto como 2-5 minutos después de la aplicación de elicitores. El Ca+2 se ha ligado a la fosforilación de proteína. Al mismo tiempo, ocurre una rápida biosíntesis de etileno y la activación transcripcional de genes relacionados a la defensa de las plantas [92].

Estos flujos iónicos, fosforilaciones proteicas y síntesis de especies activas de oxígeno cumplen funciones como componentes que ejecutan señales que activan otros genes de defensa, en lo que sería una segunda línea de defensa [68].

Sin embargo, no en todos los casos se asocia esta señalización con la inducción de respuestas

subsecuentes de defensa, como el caso que conlleva a la síntesis de fitoalexinas. Esto indica que pueden existir vías de señalización alternativas [31,39].

Algunos de estos componentes que se forman rápidamente y forman parte de las vías señaladas, pueden participar directamente en la defensa de las plantas contra patógenos. Algunas formas o especies de oxígeno, tales como el anión superóxido (O2-) y peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) son citotóxicos y debido al proceso del estallido del oxígeno pueden causar la muerte del patógeno y/o hacer lento el ingreso de éstos, al reforzar la pared celular a través de un enlazamiento cruzado oxidativo de proteínas específicas estructurales [6,18,81].

Estas formas activas de oxígeno pueden contribuir a la muerte celular en el hospedero y se asocian al colapso rápido y a la muerte de las células infectadas, proceso que ocurre durante la reacción de la hipersensibilidad. Por su parte, la reacción de hipersensibilidad parece ser un proceso multicomponente genéticamente determinado, que es poco entendido a nivel molecular. Al

parecer este proceso restringe al patógeno al privarlo de los nutrientes requeridos para el crecimiento y desarrollo. El proceso, al parecer, involucra un daño irreversible a la membrana que resulta de un escape de electrolitos y peroxidación de lípidos [9,22]. Esto causa la muerte celular y aislamiento del patógeno, que no llega a producir enfermedad.

*b) Respuestas locales de defensa*

Esta segunda clase de defensa se asocia también a la reacción de hipersensibilidad. Estas respuestas bioquímicas muchas veces involucran la síntesis de proteínas y son consecuencia de una transcripción por parte de los genes que se activan. Estas proteínas pueden directa o indirectamente restringir el desarrollo de los patógenos invasores. Estos incluyen enzimas claves de metabolismo general de polipropanoides tales como fenil alanina amonioliasa y 4-coumarato: CoA ligasa; innumerables proteínas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas y otros metabolitos secundarios; glicoproteínas ricas en hidroxipolina y proteínas ricas en glicina; proteínas relacionadas a la patogenicidad intra y extra celulares que incluyen quitinasas y 1,3-β-

glucanasa, peroxidasa, lipoxigenasa, proteinasa e inhibidores de poligalacturonasa, y proteínas antimicrobiales [107,125,132].

El metabolismo del fenilpropanoide es de mucha importancia ya que de sus tantas vías ramificadas se produce una gran variedad de compuestos con diversas funciones. Estos incluyen pigmentos, antibióticos, protectores de rayos ultravioletas, moléculas y compuestos estructurales tales como lignina, suberina y otros componentes de la pared celular, que la convierten en menos permeable a los patógenos [53].

Las fitoalexinas constituyen un grupo de componentes químicos con alto espectro de actividad antibiótica [90]. Cada especie de planta produce un conjunto característico de fitoalexinas que se derivan de metabolitos secundarios y frecuentemente constituyen derivados de fenilpropanoide, terpenoides, poliacetilenos [53].

Este tipo de defensa local se da como respuesta rápida y localizada de los mecanismos de defensa en el sitio de ingreso del patógeno, después de un reconocimiento inicial. Por esto se considera como una segunda línea de defensa que es esencial para limitar la invasión a pequeñas áreas de tejido. Aparentemente, en este tipo de respuesta, los niveles inducidos de la expresión genética es lo mismo para todas las células en toda el área afectada y existe una demarcación fija entre células totalmente activadas y aquellas sin afectar [121].

Aún cuando existe una correlación de estas formas de activación de los genes relacionados a la defensa con la reacción de hipersensibilidad, hay pocos datos que muestran una relación estrecha entre los dos mecanismos. Muchos de estos genes relacionados a la defensa pueden ser activados por elicitores que no causan la reacción de hipersensibilidad o se expresan en niveles similares en interacciones compatibles y no compatibles [9,64,124].

La reacción de hipersensibilidad solo ocurre en interacciones incompatibles y requiere la presencia de un grupo de genes conocidos como hrp. Los mutantes patogénicos que carecen de estos genes inducen la producción de sustancias relacionadas a la defensa pero no la reacción de hipersensibilidad. Además, aunque existe mucha evidencia de que la reacción de hipersensibilidad es un componente altamente importante de defensa, en muchos casos se observa resistencia independiente de este mecanismo [9]. Se puede deducir entonces que las plantas poseen otras maneras para detener la invasión.

*c) Respuestas sistémicas de defensa*

El tercer tipo de respuesta de defensa se conoce como resistencia inducida o resistencia sistémicas adquirida (SAR). La infección local por algunos patógenos puede llevar a una resistencia generalizada, aunque se reconoce una serie de elicitores bióticos y abióticos que pueden iniciar el proceso [67].

Este tipo de resistencia es efectiva contra un amplio rango de patógenos, incluyendo virus, bacterias y hongos

y puede durar por varias semanas o meses. El mecanismo se ha correlacionado con la activación sistémica de varias respuestas de defensa específicas, por una vía de transducción iniciada localmente en el sitio de ataque del patógeno. Sin embargo, de todos los mecanismos de defensa conocidos, solo algunos se correlacionan con la resistencia inducida.

Este mecanismo se considera como un componente adicional del sistema de defensa de la planta que, al ser dirigido a subsecuentes invasores, se considera como una tercera línea de defensa [66].

De los cambios notados en el proceso de inducción de defensa se encuentra la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis.

En tabaco, se reconocen por lo menos nueve familias de genes que se activan sistémicamente como respuesta a la infección local con el virus del mosaico del tabaco [142]. Estos genes codifican proteínas tales como 1.3-ß-glucanasa, quitinasas, proteínas ligadoras de quitinas,

proteínas parecidas a la taumatina, y PR1, todos con actividad antifúngica [68]. La aplicación de ácido salicílico y de ácido 1,6-dicloroisonicotínico activó estos mismos genes [66].

En varios estudios, la inducción se restringió a las isoformas acídicas de las proteínas relacionadas a la patogenicidad (PR), sugiriendo que las isoformas básicas no se involucran en la inducción sistémica [19,142]. Sin embargo, la inducción sistémica en la papa, muestra que las isoformas básicas y acídicas se involucran en el proceso [124].

Las reacciones que ocurren varían de acuerdo a la especie. Por ejemplo, en pepino, se forman otros compuestos tales como una quitinasa única de clase III, niveles elevados de peroxidada, glucoproteínas ricas en hidroxiprolina, lipogenasas y ácido salicílico [40,25]. En otros casos, específicamente en melón, tomate y tabaco, se activan inhibidores de proteinasa pero sus funciones en la resistencia no han sido establecidas [48,76,97,113].

*d) Promotores de crecimiento*

Muchos estudios han ligado el fenómeno de promoción de crecimiento por cierto grupos de organismos esencialmente bacterias saprofíticas, con la inducción de resistencia a hongos, bacterias y virus [50,77,78,143]. Sin embargo, mientras en la inducción clásica se han determinado una serie de reacciones que explican dicho fenómeno, los que explican la promoción de crecimiento no son tan claros. Muchas bacterias promotoras de crecimiento se han asociado con la estimulación de producción de compuestos bioquímicos asociados a la defensa.

Van Per et al (1991), observaron incrementos en la producción de fitoalexinas en claveles con el uso de Pseudomonas sp. En fríjol, también se han incrementado los niveles de proteínas PR [79], incremento en la actividad de peroxidasa [3], y un incremento en la lignificación [5].

Los mecanismos por los cuales algunos microorganismos causan un incremento en el crecimiento no son claros

aún. Algunos han sido propuestos para explicar el fenómeno. Se cree que la promoción de crecimiento se da como una respuesta indirecta al cambiar el balance microbial en la rizósfera [67]. Algunos de los mecanismos involucrados son, por ejemplo, que las bacterias benéficas brindan protección contra patógenos no parasíticos de las raíces, posiblemente mediante el empleo de sustancias antibióticas [21,145]. Estos organismos no parásitos se cree inhiben el crecimiento sin causar síntoma alguno.

Algunos promotores de crecimiento también cuentan con sideróforos quelantes de hierro [68], otros producen HCN, que está implicado en la supresión de bacterias deletéreas [127].

Otro mecanismo es el de producción de sustancias que promueven el crecimiento, incluyendo reguladores de crecimiento como giberelina [22], o auxinas [87]. Algunas bacterias también pueden transformar minerales no disponibles y compuestos orgánicos en formas disponibles a la planta [11]. En algunos casos, especies

como *Bacillus polymyxa*, *B. racemosus* y *B. circulans* logran fijar nitrógeno libre en condiciones anaeróbicas [88,115].

La forma como se asocian los organismos promotores de crecimiento a la defensa de la planta se puede colocar en dos grupos principales: los que controlan enfermedades por antagonismo y los que controlan enfermedades por mecanismos que no involucran la producción de compuestos tóxicos. En este último se incluyen los que compiten por sustrato o sitio y los que inducen resistencia.

# CAPÍTULO 3

## 1. MANEJO DE LA ENFERMEDAD

### 1.1. Control genético

La Sigatoka negra se favorece por la alta susceptibilidad de los principales clones de banano y plátano utilizados en explotaciones comerciales, lo que dificulta el manejo del problema. Por ello, la resistencia genética es una de las mejores alternativas para su control. Sin embargo, la obtención de materiales resistentes a la sigatoka negra con características de rendimiento y calidad aceptables, es un trabajo difícil y lento [122,123].

Se han requerido no menos de 35 años de esfuerzos intensivos y costosos de mejoramiento genético a cargo del fondo Hondureño de Investigación Agrícola (FHIA), antes de que el

primer híbrido comercial resistente a la sigatoka negra fuera desarrollado y sembrado por los agricultores [122,123].

Los diploides agronómicamente mejorados que se usan en la actualidad en forma extensiva en el programa de la FHIA son: SH-3142, como fuente de resistencia al nematodo barrenador; SH-3362, son resistentes a la Raza 4 del Mal de Panamá y SH-3437 como fuente de resistencia a la Sigatoka negra y a *Pratylenchus sp*. Estos tres diploides son a su vez resistentes a la raza más común (raza 1) del Mal de Panamá. Actualmente, en Cuba, se encuentran en producción alrededor de 4.000 hectáreas de FHIA-03; 1900 de FHIA-23 y 900 de FHIA-18, informándose que estas plantaciones no reciben ningún tratamiento químico para el control de Sigatoka negra y muestran un buen desempeño [109].

El mejoramiento genético de las variedades comerciales o el desarrollo de nuevas variedades puede ser una alternativa, sin embargo, el acceso a estos materiales a corto plazo es poco viable. Syngenta optó por desarrollar un nuevo concepto en el manejo de las enfermedades de los cultivos, tratando de fortalecer la parte inmunológica de las plantas, usando la base

genética de las mismas como fundamento de las estrategias de control [82].

## 1.2. Control biológico

Sobre este método ya se han realizado algunas investigaciones que demuestran su potencial como parte del manejo integrado de la sigatoka negra. Sin embrago, aún se necesita estudiar y comprender algunos aspectos de la biología de los microorganismos antagonistas empleados en este tipo de control [18].

En estudios realizados, a nivel de invernadero y con inoculación natural de la enfermedad, se observó que *Serratia marcences* logra controlar el desarrollo de la enfermedad de manera satisfactoria [93].

Así mismo, se identificó, bajo condiciones *in vitro*, cuatro cepas bacterianas de microorganismos productores de glucanasa con un carácter antagonista hacia *M. fijiensis* afectando en forma negativa, la germinación y longitud del tubo germinativo [138].

En el control biológico de la sigatoka negra es un método con pocas probabilidades de éxito pues, la alta virulencia y corto periodo de incubación de *M. fijiensis*, ponen en desventaja a las poblaciones del agente antagonista [50].

### 1.3. Control cultural

Estas prácticas están dirigidas principalmente a reducir la fuente de inoculo del patógeno y son parte fundamental de un programa de manejo integrado de la enfermedad.

*Eliminación total o parcial de hojas afectadas:* Esta es la práctica más importante para reducir o eliminar la principal fuente de inoculo [84,85,103]. Esta práctica, en sus diferentes modalidades se conoce como deshoje, poda, despunte o cirugía. El deshoje se considera como una poda de sanidad. Las hojas representan la única fuente de inoculo de la enfermedad, por lo que el manejo de éstas es importante para disminuir la esporulación del patógeno a través del tiempo.

*Minicomposteo:* Consiste en hacer montones con todos los deshechos de las plantas de banano dentro de la plantación. La

hojarasca, porciones de hojas que son cortadas y las plantas eliminadas después de la cosecha son apiladas en montones para provocar una rápida degradación y facilitar que sirvan como aporte de nutrimentos y materia orgánica. Todos los tejidos (hojas y pseudotallo) deben ser cortados para lograr una eficiente descomposición. Los montones de deshechos deben hacerse entre las calles a una distancia de 5 a 6m [103].

*Drenaje:* Los sistemas de drenaje permiten la rápida eliminación de los excesos de agua dentro del huerto, lo cual además de mejorar el crecimiento del cultivo, reduce las condiciones de alta humedad relativa favorables para el desarrollo del patógeno [48,103].

*Manejo del agua y métodos de riego:* El riego es una práctica importante en el manejo de las plantaciones de banano y plátano bajo condiciones de trópico seco, ya que gracias a ello se abastece al cultivo del agua necesaria durante la época seca. Con el suministro adecuado de humedad, se desarrollan plantas vigorosas y se mantiene un ritmo de emisión foliar normal en los períodos poco favorables para la enfermedad [100].

*Nutrición y fertilidad del suelo:* El crecimiento de las plantas de banano y plátano depende de la calidad del suelo. En suelos pobres, la emisión foliar se retrasa y se obtienen plantas más raquíticas. El desarrollo de la Sigatoka negra está estrechamente relacionado al crecimiento de la planta hospedera. Mientras más pobre es el crecimiento, la influencia de la enfermedad es más severa. Para lograr un control efectivo de la enfermedad, se deben optimizar todas las condiciones de crecimiento de las plantas [48].

*Densidad de plantación:* La alta densidad de siembra de algunos cultivares de banano y plátano es una práctica factible de utilizarse para incrementar la producción por unidad de superficie. La mayoría de los estudios de densidad de plantación, han tenido como objetivo principal evaluar su influencia en el crecimiento y la productividad de estas musáceas [4,12,74].

*Control de malezas:* Existen reportes generales, donde se señala que un buen control de malezas dentro de las plantaciones permite una aireación adecuada y evita

condiciones de alta humedad relativa que favorezcan el desarrollo del hongo. Asimismo, las malezas son nocivas al cultivo de banano y plátano, ya que compiten por agua, nutrientes, espacio y algunas son hospederas [85,101].

## 1.4. Control químico

En los países donde se ha presentado la Sigatoka negra, el control químico se ha realizado utilizando fungicidas sistémicos, sistémicos locales y protectantes [28].

Dentro de los métodos de combate de sigatoka negra actualmente usados, el control químico es la alternativa más común en las plantaciones comerciales de banano [101,104,134]. Existe una serie de grupos químicos que son ampliamente utilizados para su combate:

*Fungicidas sistémicos*

Estos fungicidas tienen la capacidad de penetrar los tejidos y de ser movilizados a otras partes de las planta, contando con un modo de acción muy especifico que interfiere con la síntesis de los esteroles [28].

Estos fungicidas tienen la ventaja de no ser lavados por las lluvias, lo que permite reducir el número de tratamientos anuales y de ser compatibles con soluciones aceitosas y acuosas empleadas como adyuvantes [28].

A este grupo de fungicidas pertenecen:

*Triazoles:* El modo de acción ocurre en la biosíntesis del ergosterol, pero actúan a un nivel diferente de las morfinas, inhibiendo el proceso de metilación, por lo que son llamados DMi's (sterol-demethylation-inhibiting) por sus siglas en inglés [85].

*Benzimidazoles:* Actúan en las proteínas globulares de las células, proteína que se encuentra en el citoplasma y es de vital importancia para la formación de la parte acromática, por lo tanto es un inhibidor de la mitosis. El fungicida más utilizado de este grupo es el Benomil (Benlate) [85].

*Estrobilurinas:* Son derivados sintéticos de compuestos que se producen naturalmente (*Strobilurus tenacellus*) con una

actividad antifúngica de amplio espectro [52]. El modo de acción sobre un sitio específico se basa en la inhibición de la respiración mitocondrial, del transporte de electrones o de la respiración [16].

El Azoxystrobin es un compuesto ampliamente utilizado en los programas de control de sigatoka negra en la mayoría de las regiones productoras de banano [41,86,104].

Este fungicida sistémico se formula como concentrado emulsionable y posee acción sobre diversos hongos fitopatógenos de importancia económica, entre los que se encuentra *M. fijiensis*, causante de la Sigatoka negra del banano.

*Fungicidas sistémicos locales*

Este es un grupo intermedio de fungicidas, los cuales penetran en las hojas pero no se traslocan al resto de la planta. El Tridemorph (Calixin) es el único fungicida utilizado en banano, que se incluye en este grupo. Pertenece a la familia química de las Morfolinas, cuyo modo de acción se encuentra entre los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (EBI's) [16].

Actúa en dos etapas diferentes de la biosíntesis de los ergosteroles, por lo que la generación de cepas resistentes a este fungicida es menos probable. Posee la ventaja de que no se ha encontrado resistencia cruzada a los triazoles, lo que permite que pueda ser empleado en la rotación de fungicidas de modo de acción de distintos [85].

*Fungicidas protectantes*

La función básica de estos fungicidas es la de prevención, donde la planta es cubierta por el producto, formando una capa superficial sobre las hojas, sin penetrar en ellas. El hongo al ponerse en contacto con el ingrediente activo del fungicida no se desarrolla, por lo tanto, no penetra en las células del tejido foliar [28].

Estos fungicidas se utilizan cuando el porcentaje de infección es bajo, lo que sucede en épocas secas o cuando las condiciones no son lo más favorables. Tienen las desventajas de ser lavados por las lluvias y la distribución en el envés de la hoja es incompleta [85].

*Resistencia a fungicidas*

Los fungicidas han sido usados por alrededor de 210 años para proteger las plantas contra enfermedades causadas por hongos. El comienzo de la larga escala de aplicación de fungicidas para el combate de enfermedades fungosas está marcado por la mezcla de preparación artesanal de caldo bordelés. Esta preparación contenía una mezcla de sulfato de cobre y cal, que permaneció como el fungicida más usado por más de 50 años [30].

*Aspectos generales sobre resistencia*

La resistencia a fungicidas se define como el cambio hereditario de una célula fungosa o una población de un hongo a un fungicida, lo que resulta en una sensibilidad menor a lo normal hacia este.

El uso comercial de un fungicida durante algunos años, puede generar poblaciones de patógenos que no son lo suficientemente sensibles para ser controlados adecuadamente. Ellos aparecen generalmente, como una respuesta al uso repetitivo del fungicida o al uso de otros fungicidas químicos relacionados y/o con un mecanismo bioquímico de acción

fúngico similar. Las poblaciones del patógeno que desarrollan la resistencia a un fungicida pueden llegar a ser simultáneamente y automáticamente resistentes a otros fungicidas que son afectados por la misma mutación del gen, siguiendo el mismo mecanismo de la resistencia [20]. El mismo autor, señala que con la introducción de los fungicidas sistémicos, la incidencia de la resistencia creció y el tiempo de aparición de esta es a menudo relativamente corto.

Se presentan las siguientes clases de resistencia [30]:

*Resistencia discreta:* Se caracteriza por una repentina y marcada pérdida de efectividad y por la presencia de poblaciones sensibles y resistentes del patógeno, las cuales difieren ampliamente en su respuesta hacia el fungicida.

*Resistencia cuantitativa:* Se caracteriza por una pérdida lenta del control de la enfermedad y por la sensibilidad de la población del patógeno. A través de la disminución en el uso del fungicida y la alternancia con fungicidas de diferente modo de acción, esta resistencia puede ser revertida a poblaciones nuevamente sensibles.

*Resistencia cruzada:* *Se* presenta cuando las poblaciones de un patógeno en particular desarrollan resistencia a un fungicida y automática y simultáneamente se hace resistente a otros fungicidas que son afectados por la misma mutación y por el mismo mecanismo de resistencia.

*Resistencia múltiple:* Algunos patógenos pueden poseer mecanismos de resistencia separados a dos o más fungicidas no relacionados. Estos han surgido a partir de mutaciones independientes que fueron seleccionadas por exposición a cada uno de los fungicidas.

# CAPÍTULO 4

## 3. PRODUCTOS A BASE DE EXTRACTOS DE PLANTAS

### 3.1. Antecedentes de los extractos de plantas

Se estima que en el mundo existen entre 310.000 y 422.000 especies de plantas, encontrándose en los bosques tropicales cerca de 125.000 especies [110]. Dentro de esta vasta diversidad, existen especies vegetales con propiedades de interés para la investigación y el descubrimiento de nuevos productos. Sin embargo, se calcula que menos del 10 % de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica [55].

Como parte de su metabolismo, las plantas producen una diversidad de compuestos orgánicos, de los cuales la mayoría

no parece tener participación directa en su crecimiento y desarrollo. A estos componentes se les conoce como metabolitos secundarios y sus propiedades químicas se han investigado ampliamente desde a mediados del siglo XIX [83]. Esta diversidad bioquímica es el resultado de la coevolución entre plantas y otros organismos, incluyendo virus, bacterias, nemátodos, insectos y mamíferos [32,29,34,116,140].

El reconocimiento de las propiedades de los metabolitos secundarios ha conducido a la búsqueda de nuevos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas [29]. Ejemplos de agroquímicos derivados de productos naturales son los piretroides sintéticos [72,117], la azadiractina, la nicotina, la rotenona, la sabadilla y la ryania [23,117]. Por su lado, la industria farmacéutica muestra un éxito notable en el descubrimiento de medicamentos originados a partir de productos naturales, entre otros la aspirina, la digoxina, la morfina, la quinina y el taxol [56].

Las plantas, tanto en su ambiente natural como en ambientes de cultivo, necesitan defenderse de condiciones adversas y enemigos naturales. Sin embargo, los cultivos agrícolas se han

especializado en la producción de sustancias energéticas, reduciendo su capacidad para defenderse [36].

## 3.2. Propiedades y características de los extractos

### Propiedades

El primer y más importante paso en el control de plagas, es identificar el agente causal “organismo causal” [83]. El efecto de los productos botánicos puede afectar en las plagas o en los cultivos, las propiedades de los extractos:

- *Repelente*
- *Atrayente*
- *Insecticida*
- *Fungicida*
- *Herbicida*
- *Rodenticida*
- *Esterilidad*
- *Afecta desarrollo*
- *Anti-alimentario*
- *Abono foliar*
- *Nematicida*

El efecto de los extractos de plantas sobre las plagas puede verse opacado o mal interpretado en las siguientes situaciones:

- No presencia de la plaga al momento de la aplicación del producto.
- No afecta a la plaga.
- Repelente por olor
- Repelente por cambio de coloración del cultivo
- Efecto tóxico.
- Inhibe el desarrollo de los diversos estadíos de la plagas (insectostático, fungistático, nematostático) [83].

**Características**

Una de sus principales características reside en la diversidad de aplicaciones industriales que estos extractos poseen. A modo de ejemplo, pueden utilizarse como ingredientes naturales y potenciales componentes para el desarrollo de nuevos productos de la industria alimenticia, como colorantes y saborizantes, en la industria farmaceútica como suplementos dietéticos, nutracéuticos y antioxidantes, en la industria

cosmética y de belleza, para la elaboración de cremas y shampoo y en la industria agrícola como astringentes [35].

### 3.3. Los extractos en el control de enfermedades.

Durante la última década se ha investigado el uso de extractos vegetales, que puedan proporcionar protección más duradera, con menor toxicidad y que resulten más viables económicamente [119].

Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas. Ellas producen diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc [51,105].

Debido a la importancia que la enfermedad de la Sigatoka negra representa para el cultivo de banano, se realizaron diversos estudios acerca del efecto de estos extractos de plantas sobre el desarrollo de *M, fijiensis*, agente causal de la enfermedad mencionada. Con relación a la búsqueda de extractos vegetales

con acción sobre la *M. fijiensis* se tienen trabajos desarrollados [106], quién encontró que el extracto alcohólico de *Senna reticula* (Fabaceae) presentó la mayor actividad protectora *in vitro* contra la sigatoka negra y los posibles metabolitos secundarios responsables de esta actividad están relacionados con polifenoles, coumarinas, quinonas, saponinas, triterpenos y/o flavonoides. Así mismo, los extractos de *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) mostraron actividad *in vitro* contra *M. fijiensis* [106,111].

Se analizaron el efecto de 20 extractos etanólicos sobre el crecimiento y desarrollo de las ascosporas y colonias de *M. fijiensis* y encontraron que los más potentes fueron los de *Commelina difusa*, *Momordica charantia*, *Pavonia* sp., *Plenax* sp., *Piper hispidum*, *Piper peltatum*, *Sida rhombifolia* y *Sysygium aromaticum*. De estos, el extracto que mostró la máxima actividad fue el de *S. aromaticum* [120].

### 3.4. Extractos de Cítricos

En la historia de los primeros europeos, escribieron sobre cítricos persas, que había un perfume maravilloso y se pensaba

que era un remedio para el envenenamiento, un edulcorante de aliento, y un repelente para las polillas [59].

Dentro de los compuestos vegetales se encuentran los extractos de cítricos que han demostrado poseer propiedades antimicrobianas. El efecto antifúngico de la cascara del limón sobre *Penicillium digitatum* [15]; el efecto bactericida del extracto de semillas de toronja, bajo condiciones controladas, sobre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Candida maltosa* fue demostrado en un sinnúmero de bioensayos [146].

## 3.5. Extractos de Neem

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y paraíso (*Melia azedarach L.*) son dos árboles pertenecientes a la familia de la caoba *(Meliaceae).* El neem es una árbol de hoja perenne [126] y fue introducido en Egipto desde Sudán en 1963 [10]. Por otra parte, chinberry es un árbol caducifolio nativo del sur de Asia y Australia [33] y es un viejo árbol en Egipto [10] con el valor de la reputación por las propiedades anti- fúngicas [5].

Se demostró que el extracto de hoja de *A. indica* controló al *Fusarium oxysporum* en hojas y frutas de bananos infestadas [131].

Se informó que el extracto de hoja de Neem inhibe el crecimiento del micelio y la germinación de esporas de *Helminthosporium oryzae* y *Pyricularia oryzae,* responsable de la explosión y la mancha marrón de la planta de arroz [45].

Demostraron que las propiedades fungicidas de los extractos de hojas de *Azadirachta indica*, en frutas de pera controló en un 85% la pudrición afectada por *Alternaria solani* [133].

Se informaron que el extracto de la hoja de *Melia azedarach* es un buen inhibidor de *Micropus bipolaris* pero fue parcialmente inhibidor de *Alternaria solani*, con poco o ningún efecto de *Fusarium oxysporum* como patógenos en pruebas de tomate [80].

Mostraron que el extracto de hoja de Neem es eficaz en la reducción de la incidencia del tizón temprano en plantas de tomate infectadas por *Alternaria solani* [180].

Los extractos de plantas han jugado papel importante en la inhibición de agentes patógenos en semillas transmitidos por *Fusarium oxysporum* [99].

Se notificó que el extracto de hoja de *Azadirachta indica* era altamente inhibidora de *Phaeoisariopsis*, el agente causal de la mancha foliar tardía de cacahuete [69].

Se indicó que Trilogy, un producto natural de *Azadirachta indica*, en pepino retrasó el crecimiento y resistencia en *Podosphaera xanthii* [1].

# CAPÍTULO 5

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de esta investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), edificio PROTAL de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus “Gustavo Galindo” ubicado en el Km 30,5 de la vía Perimetral en la ciudad de Guayaquil-Ecuador.

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Material Biológico: Fungoso

***Ascosporas***

Se seleccionaron hojas que se encontraban infectadas con Sigatoka negra en campo y se separaron las partes con presencia de síntomas de nivel 5 en la escala de Stover. Cada parte seleccionada fue limpiada con agua destilada y alcohol; se realizaron cortes de 4 X 4cm los

cuales fueron grapados en papel filtro y colocados en cámara húmeda durante 48 horas a temperatura ambiente.

Los papeles fueron colocados impregnados a las tapas de cajas Petri con medio PDA para permitir la descarga durante una hora; luego de la descarga, las cajas Petri fueron incubadas 48 horas a $26^0$C en total oscuridad.

***Conidias***

Las ascoporas obtenidas se subcultivaron sobre medio PDA por siete días; luego la colonia fue colocado en medio Mycophil durante 20 días con ausencia de luz y a $20^0$C. Luego de este período, el micelio fue dividido, disuelto en agua Tween™ 20 (0.005%) y trasladado a un medio modificado V8 sólido (pH 6), en el cual se mantuvo por siete días bajo condiciones controladas de luz y $26^0$C.

Transcurrido el tiempo definido se obtuvieron nuevas colonias, que después de siete días presentaron estructuras diferenciales, las mismas que fueron

recolectadas con una solución de agua Tween$^{TM}$ 20 (0.005%) y mediante un agitador se obtuvieron soluciones conidiales que se utilizaron en los ensayos posteriores y para la obtención de colonias.

***Colonias***

Estas se obtuvieron a partir de una solución conidial la cual fue establecida en medio PDA (papa-dextrosa-agar) y mantenidas en incubación por un período de siete días a $26^0$ C.

***Extractos vegetales***

Los productos en estudio fueron:

i. Extracto de Cítrico con el 37% de ingrediente activo que contiene Aceite de Naranja y Alcohol etoxilatos con un pH de 5.5
ii. Extracto de Neem con el 70% del concentrado de las semillas y hojas de Neem y con un pH de 5.5.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, debido a que todos los factores estuvieron controlados.

TRATAMIENTOS

Los tratamientos del diseño están dados por las dosis que se van a utilizar, tal como se describe en la tabla 5.1 y 5.2

**Tabla 5.1** Producto Extracto de Cítricos (EC) con dosis utilizadas en los ensayos en la esterilización al calor (autoclave) y al frío (filtración)

| | Dosis utilizada en los ensayos (ppm) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,00 | 0,10 | 0,30 | 0,50 | 1,00 | 3,00 | 5,00 | 10,00 | 30,00 |
| Volumen por concentracion (ml/lt) | 0,00 | 0,27 | 0,80 | 1,33 | 2,65 | 7,95 | 13,95 | 26,50 | 79,50 |
| pH | 5,5 | 5,5 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 7,0 |

**Tabla 5.2** Producto Extracto de Neem (EN) con dosis utilizadas en los ensayos en la esterilización al calor (autoclave) y al frío (filtración)

| | Dosis utilizada en los ensayos (ppm) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,00 | 0,10 | 0,30 | 0,50 | 1,00 | 3,00 | 5,00 | 10,00 | 30,00 |
| Volumen por concentracion (ml/lt) | 0,00 | 0,14 | 0,43 | 0,71 | 1,42 | 4,26 | 7,10 | 14,20 | 42,60 |
| pH | 6,0 | 6,0 | 5,5 | 5,5 | 5,5 | 5,5 | 5,5 | 5,5 | 5,5 |

### 4.1.2. Materiales de Laboratorio

El material de laboratorio utilizado se encuentra detallado en el APENDICE 1

## 4.2. Efecto sobre la germinación de ascosporas de *M. fijiensis.*

En este ensayo se evaluó el crecimiento de ascosporas y para su evaluación a continuación se detalla el protocolo:

Se seleccionó hojas enfermas con *M. fijiensis* en campo y se trasladó al laboratorio. Con ayuda del estéreo-microscopio se escogió los pedazos de hoja donde se observó mayor presencia del hongo; se procedió a limpiar el envés de la hoja con un

algodón empapado de agua destilada y se recortó los pedazos de hojas en partes más pequeñas, de 4 x 4 cm aproximadamente y se los grapó en papel filtro.

En una caja de plástico se preparó una cámara húmeda colocando algodón en la base empapado con agua destilada, donde se colocó los papeles con las hojas en la caja con algodón y se la tapó, durante cuarenta y ocho horas. Se preparó medio agar-agua y se esterilizó en autoclave a $121^0$C y 15 lb/pul$^2$ por veinte y cinco minutos. En la cámara de flujo laminar se le añadió al medio las concentraciones del extracto de cítricos en las respectivas dosis siendo esterilizado por filtración con una membrana Durapore® de 0.22um, se lo dispensó en cajas petri.

Pasadas cuarenta y ocho horas se colocó los papeles en la tapa de la caja petri, teniendo en cuenta que las hojas se encontraran hacia abajo y no tocan el medio, el papel permaneció así por dos horas, luego de transcurrido el tiempo mencionado se retiró el papel y las cajas fueron sometidas en una incubadora a $26^0$C y en total oscuridad, por cuarenta y ocho

horas más, luego de ese tiempo se las retiró de la incubadora y se evaluó la germinación de las ascosporas.

***Parámetros a evaluar***

*Germinación del tubo germinativo:*

A los tres días de inoculados los tratamientos, y utilizando el microscopio invertido, se evaluó cien ascosporas por cada tratamiento. En las ascosporas seleccionadas se midió el crecimiento mas largo de uno de los tubos y para ser medidas

***Análisis de datos***

En este ensayo se realizaron nueve tratamientos con cien observaciones utilizando el diseño completamente al azar (DCA), para el análisis de los datos se utilizó tablas Probit y para conprobar la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los promedios obtenidos de los diferentes tratamientos, se aplico el análisis de varianza (ANOVA) de dos colas y pruebas de significancia de Tukey.

### *4.3.* Efecto de los extractos sobre la biomasa hifal de *M. fijiensis.*

El crecimiento de micelio de *M. fijiensis* se valoró utilizando medio de cultivo líquido en donde se realizó siembras a partir de soluciones conidiales. El protocolo de establecimiento del ensayo y evaluación se describe a continuación:

***Preparación del ensayo:***

El medio de cultivo utilizado fue PD-V8 modificado (protocolos estandarizados CIBE), después que se preparó el medio líquido se lo dividió en erlenmeyers según el número de tratamientos planificado, se emplearon dosis de 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 30.0 ppm y el testigo. Luego se los procedió a esterilizar en una autoclave a $121^0$ C y 15 lb./pul$^2$ por un espacio de veinte y cinco minutos, aplicando los dos métodos de esterilización (por filtración y por autoclave).

Para el ensayo se seleccionó colonias de *M. fijiensis* individuales y de un diámetro similar (2mm) y que fueron cortadas con bisturí e inoculadas en medio líquido. Una vez que se realizó la inoculación por tratamiento, los erlenmeyers fueron incubados por veinte días bajo condiciones de luz continua (4,000 Lux ± 200) y en movimiento, utilizando una zaranda New Brunswik a 140 r.p.m.

*Esterilización por filtración:*

En la cámara de flujo laminar se le aplicaron las respectivas dosis de los extractos, los mismos que fueron sometidos a una filtración por una membrana Durapore® de 0.22 µm., para luego ser mezclados con el medio PDA y finalmente dispensados en las cajas Petri.

*Esterilización por autoclave:*

En el laboratorio se le aplicó las respectivas dosis de los extractos en cada uno de los diferentes erlenmeyers y se los procedió a esterilizar en una autoclave a $121^0$ C y 15 lb./$pul^2$ por un espacio de veinte y cinco minutos y finalmente en la cámara de flujo laminar se dispensaron en las cajas petri.

***Parámetros evaluados***

*Peso de micelio:*

Transcurridos veinte días a partir de la siembra, se filtró el micelio de cada erlenmeyer utilizando papel filtro estéril previamente pesado; luego se registró su peso a las cinco horas (peso húmedo) y a los dos días (peso seco).

***Análisis de datos***

En este ensayo se realizaron nueve tratamientos con diez observaciones en cada uno, utilizando el diseño completamente al azar, (DCA); para realizar el análisis de los datos se trabajó con los promedios del peso seco de cada tratamiento y medidas de tendencia central.

## *4.4.* Efecto de los extractos sobre el crecimiento de colonias de *M. fijiensis*

El crecimiento de colonias de *M. fijiensis* se valoró utilizando medio de cultivo sólido en donde se realizó siembras de órganos asexual del patógeno. El protocolo utilizado se describe a continuación:

***Preparación del ensayo***

Se preparó medio de cultivo de PDA Difco®, en las cantidades necesarias de acuerdo al número de tratamientos descritos previamente, luego se dividió en erlenmeyers y se procedió a esterilizar en una autoclave a $121^0$ C y 15 lb./$pul^2$ por un espacio de veinte y cinco minutos, aplicando los dos métodos de esterilización antes descritos (por filtración y por autoclave).

La solución conidial que se sembró, fue cuantificada utilizando una cámara de neubauer para conocer su concentración, obteniéndose una concentración de 7 x $10^3$ conidias/ml. Utilizando una micropipeta se colocó 100 ul de solución conidial en cada una de las cajas. Seguidamente las cajas fueron selladas utilizando cinta Parafilm "M"® para posteriormente ser incubadas a $26^0$C en total oscuridad, por siete y quince días, tiempo en los cuales se realizaron las evaluaciones.

***Parámetros a evaluar***

*Diámetros de colonias:*

A los siete días y quince días de la siembra de las colonias, la medición se realizó con la ayuda de un microscopio invertido a los siete días y con una regla milimétrica a los quince días,

aunque en algunos ensayos en ambas fechas de medición se utilizó la regla milimétrica.

*Porcentaje de inhibición:*

Este parámetro se calculó tomando como referencia las medidas del diámetro de las colonia, tanto de los tratamientos y comparadas con las de control, los datos fueron introducidos en tablas Probit, las que arrojan el porcentaje de inhibición.

***Análisis de datos***

En este ensayo se realizaron nueve tratamientos, cada uno con veinte y cinco observaciones; utilizando el diseño completamente al azar (DCA), para el análisis de los datos se utilizó tablas Probit y para comprobar la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los promedios obtenidos de los diferentes tratamientos, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de dos colas y pruebas de significancia de Tukey, también se utilizó el método gráfico de regresión lineal simple para la estimación de la dosis letal media (DL50). En el análisis de diferencia entre los tratamientos se utilizó Mam-Whitney y como los datos no son normales se hizo la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

# CAPÍTULO 6

## 1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la evaluación *In vitro* de los productos comerciales a base de extractos de cítricos y extractos de Neem sobre estructuras de *M. fijiensis.*

### 1.1. Efecto sobre la germinación de ascosporas de *M. fijiensis*

***Extractos de cítricos***

En el gráfico 6.1.1 se observó que a mayor concentración del producto a base de extractos de cítricos existe una disminución en el crecimiento del tubo germinativo de *M. fijiensis*; a partir de la concentraciones 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 ppm estadísticamente los valores se mantienen constantes y en las dos últimas 10.0 y 30.0 ppm no existe crecimiento del tubo germinativo.

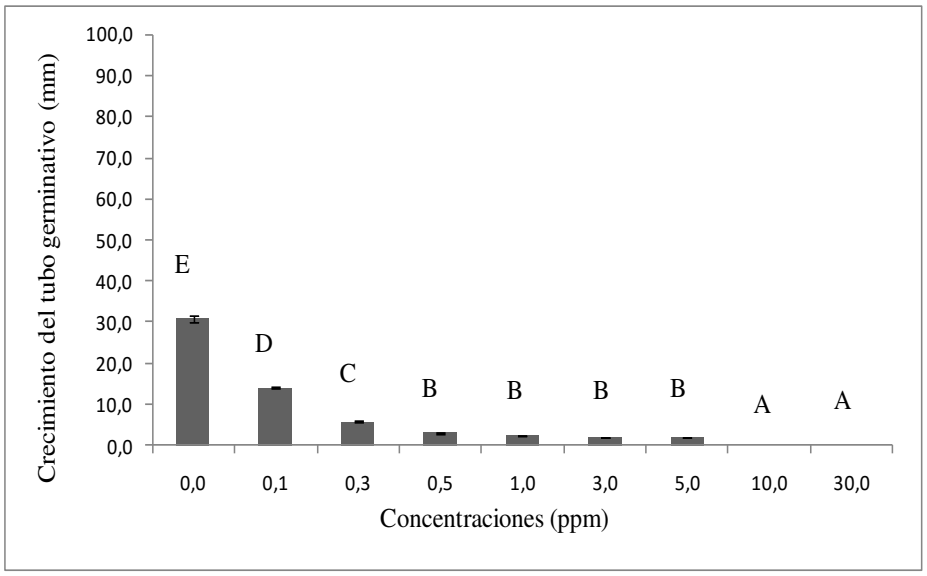


**Gráfico 6.1.1** Efecto de los extractos de cítricos sobre el crecimiento del tubo germinativo del hongo en medio sólido por el método de filtración. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

***Extractos de neem***

En el gráfico 6.1.2 se observó que el tubo germinativo que menos creció fue en la mayor concentración experimentada (30.0 ppm); sucedió lo contrario para el caso del control.

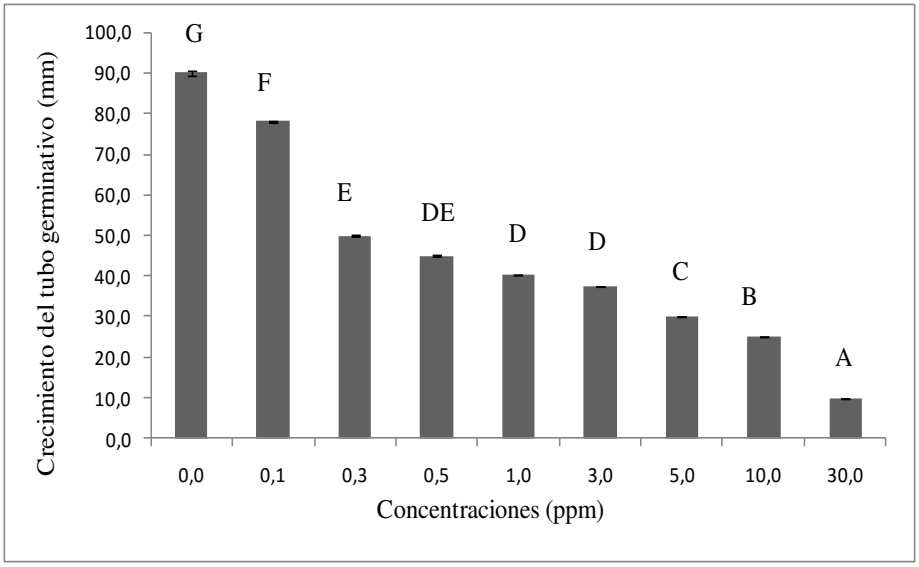


**Gráfico 6.1.2** Efecto de los extractos de Neem sobre el crecimiento del tubo germinativo del hongo en medio sólido por el método de filtración. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

## 1.2. Efecto de los extractos sobre la biomasa hifal de *M. fijiensis*

***Extractos de cítricos***

En el gráfico 6.2.1 se puede apreciar que a partir de la concentración 0.5 - 30.0 ppm no existe diferencia estadística, es donde se presentaron los valores más bajos en peso del micelio con el producto a base de extractos de cítricos; el control y 0.1

ppm muestra mayor peso de micelio respecto al resto de tratamientos experimentados.

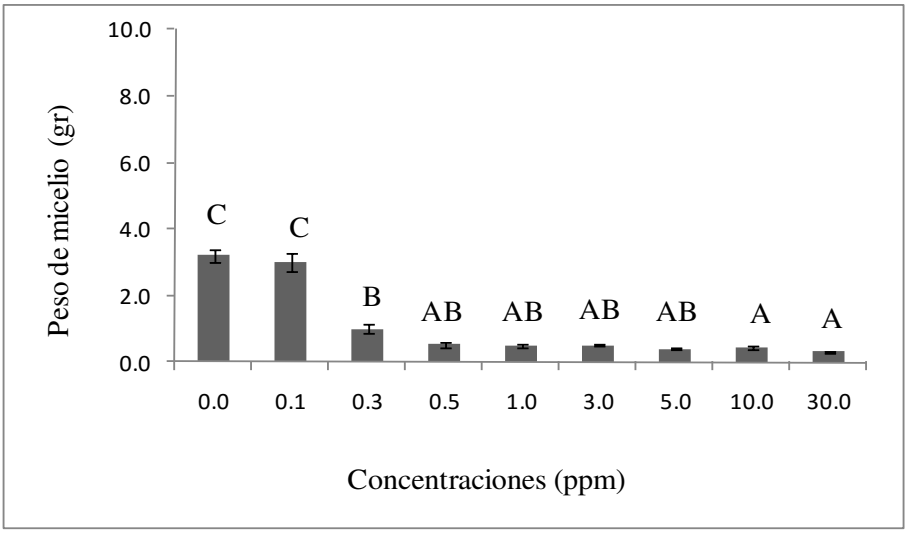


**Gráfico 6.2.1** Efecto del extracto de cítricos sobre el peso del micelio (g) del hongo, evaluado a los 20 días en medio líquido por el método de autoclave. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

En el gráfico 6.2.2 se puede observar que en el control y la concentración 0.1 ppm los pesos del micelio son más altos, a diferencia de las otras concentraciones evaluadas; y en 1.0 ppm se obtuvo el menor peso del micelio.

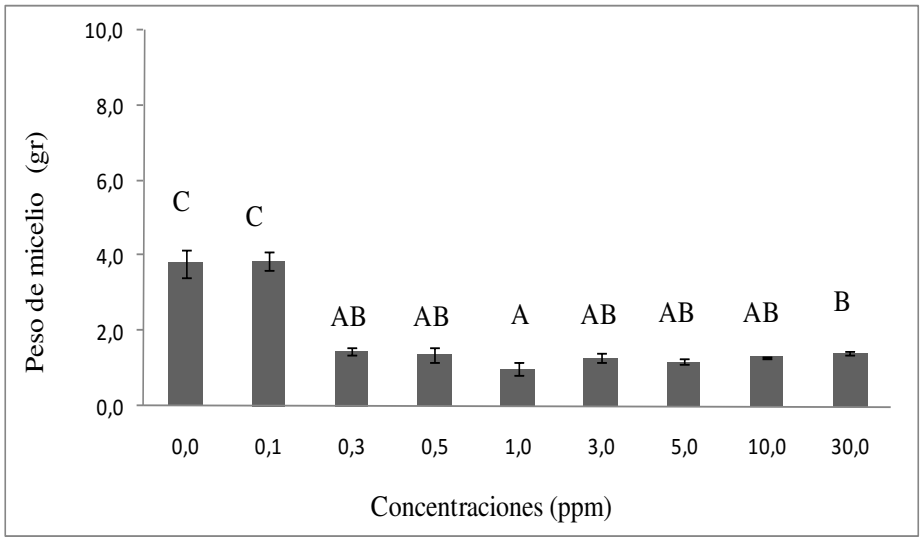


**Gráfico 6.2.2** Efecto del extracto de cítricos sobre el peso del micelio (g) del hongo, evaluado a los 20 días en medio líquido por el método de filtración. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

***Extractos de Neem***

En el gráfico 6.2.3 se observó un comportamiento variable en el crecimiento del hongo para las diferentes concentraciones aplicadas; como referencia se tiene la dosis 30.0 ppm que demostró el menor peso de micelio, aunque presentó igualdad estadística con otros tratamientos. En la concentración 0.3 ppm el crecimiento del peso del micelio fue superior, respecto a los demás.

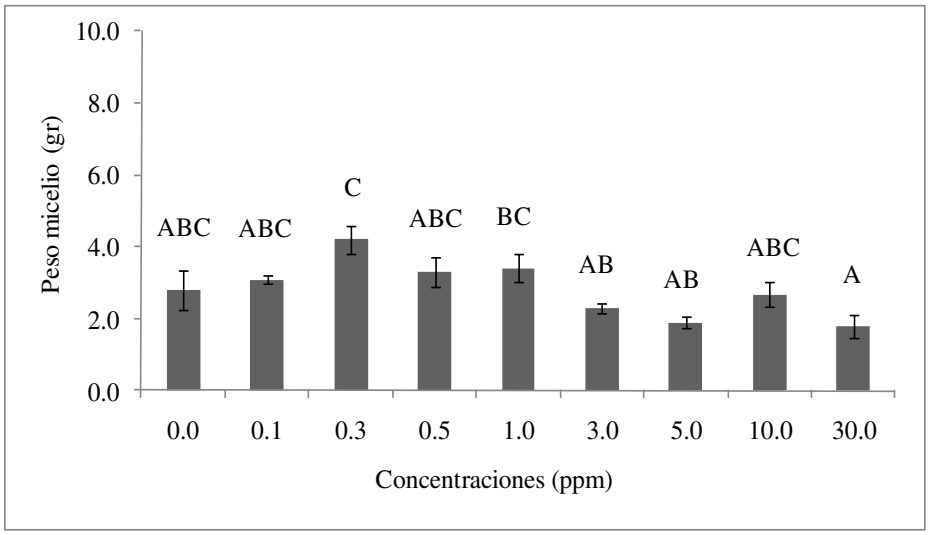


**Gráfico 6.2.3** Efecto del extracto de Neem sobre el peso del micelio (g) del hongo, evaluado a los 20 días en medio líquido por el método de autoclave. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

En el gráfico 6.2.4 se observó que a mayor concentración del producto a base de extractos de neem existe una disminución en el peso de micelio de *M. fijiensis*; a partir de la concentraciones 3.0 – 30.0 ppm estadísticamente los valores se mantienen constantes; mientras que el control y las dosis siguientes (0.1 y 0.3 ppm) indican el mayor peso para micelio.

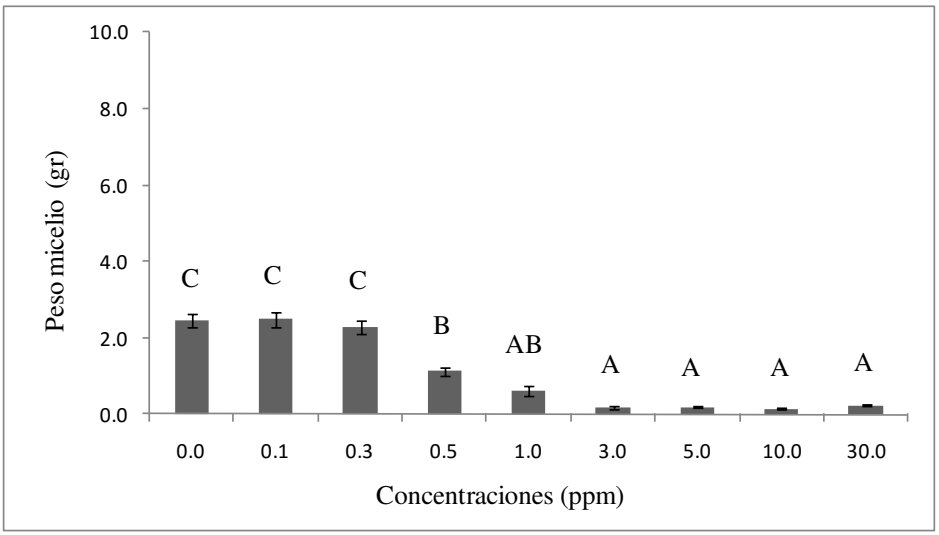


**Gráfico 6.2.4** Efecto del extracto de Neem sobre el peso del micelio (g) del hongo, evaluado a los 20 días en medio líquido por el método de filtración. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

## 1.3. Efecto de los extractos sobre el crecimiento de colonias de *M. fijiensis*

***Extractos de cítricos***

En la tabla 6.3 muestra como a los siete y quince días el diámetro de las colonias de *M. fijiensis* creció en los medios correspondientes al control y al 0.1ppm, mientras que en los

tratamientos 0.3 – 30.0 ppm no se observó crecimiento, lo que evidenció un efecto inhibitorio del 100%.

| Diámetro a los 7 y 15 días | | |
|---|---|---|
| **Concentraciones** | **Promedio** | **Diferencia estadistica** |
| 0,0 | 1 | C |
| 0,1 | 0,5 | B |
| 0,3 | 0 | A |
| 0,5 | 0 | A |
| 1,0 | 0 | A |
| 3,0 | 0 | A |
| 5,0 | 0 | A |
| 10,0 | 0 | A |
| 30,0 | 0 | A |

**Tabla 6.3** Efecto del extracto de cítricos, esterilizado por el método de autoclave, sobre el diámetro de colonias (mm) en evaluaciones realizadas a los siete y quince días. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

En los gráficos 6.3.1 y 6.3.2 se muestra el porcentaje de inhibición del hongo, pero no indica la dosis letal media estimada de la población, ya que a partir de la dosis 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 ,10.0 y 30.0 ppm la inhibición obtenida fue del 100%. El comportamiento de ambos fue similar es decir no influyó el tipo de esterilización.

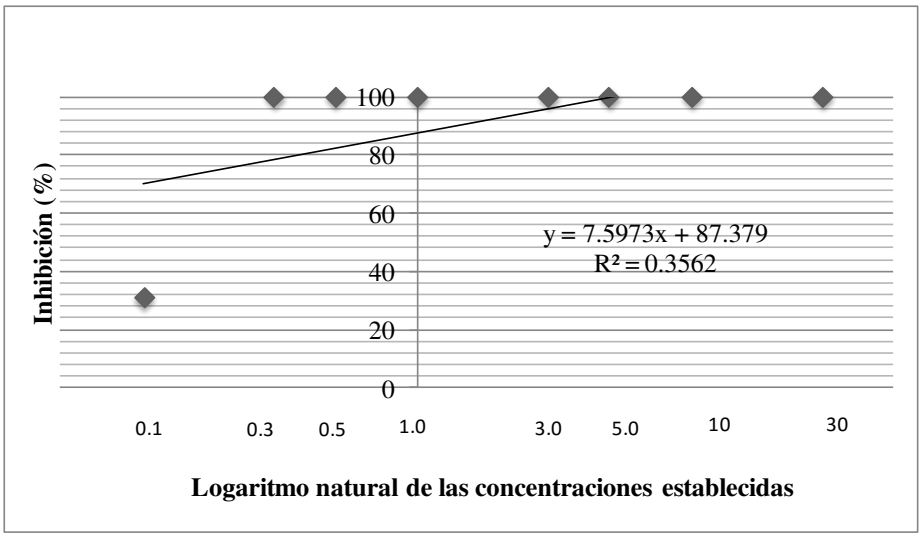


**Gráfico 6.3.1** Análisis de la relación entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo natural de las dosis con el extractos cítricos por el método de autoclave.

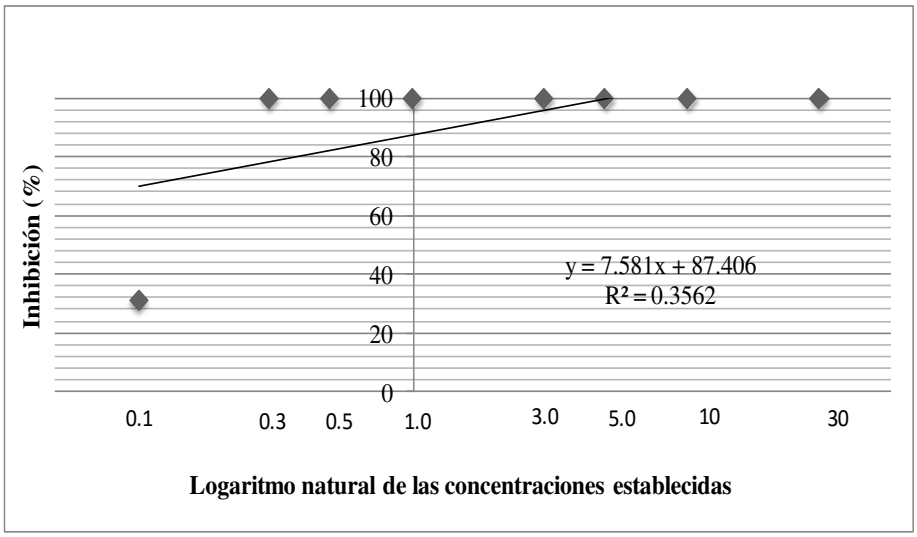


**Gráfico 6.3.2** Análisis de la relación entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo natural de la dosis con el extractos cítricos por el método de filtración.

***Extractos de Neem***

El gráfico 6.3.3 muestra que a los siete y quince días la concentración 30.0 ppm presenta el menor diámetro de *M. fijiensis* y difiere estadísticamente del control y del resto de concentraciones. Comparando el mismo intervalo de tiempo la concentraciones 0.1 y 0.3 ppm presentó valores superiores en el diámetro de la colonia.

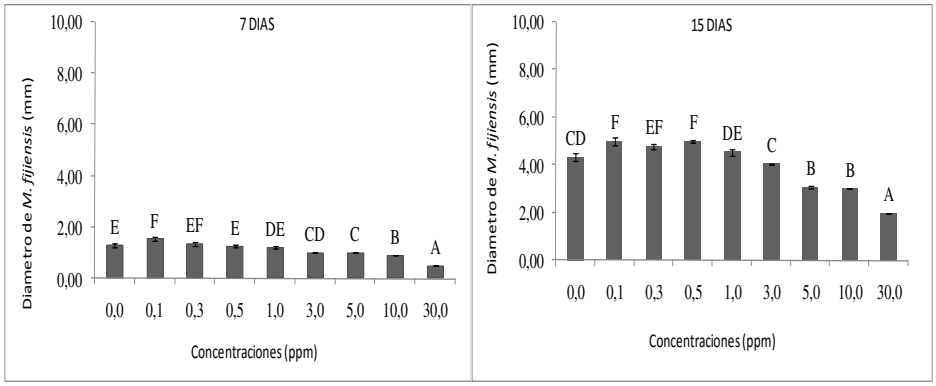


**Gráfico 6.3.3** Efecto del extracto de Neem, esterilizado por autoclave, sobre el diámetro de colonias (mm) en evaluaciones realizadas a los siete y quince días. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

En el gráfico 6.3.4 se observa el porcentaje de inhibición de 53.92 % en las dosis de 30 ppm, siendo su dosis letal media (DL50) 40,9ppm.

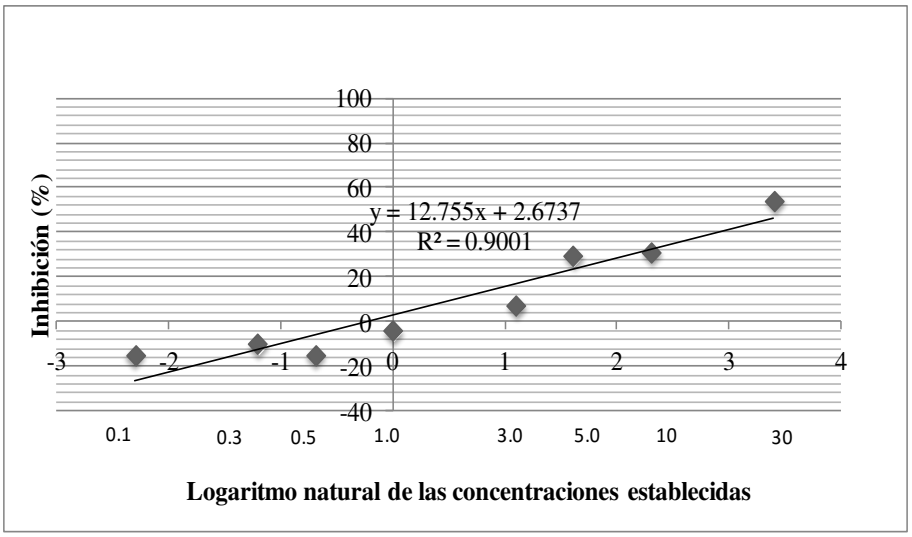


**Gráfico 6.3.4** Análisis de la relación entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo natural de la dosis con el extracto de Neem por autoclave, presenta la línea de regresión lineal y el coeficiente de determinación del modelo.

En el gráfico 6.3.5 muestra en ambos tiempos que existe una disminución en el diámetro de la colonia a medida que las concentraciones incrementan, donde el control es el que presenta el mayor valor en diámetro a diferencia del resto de

tratamientos, lo contrario ocurre con la concentración 30.0 ppm ya que presenta diámetros inferiores en la colonia.

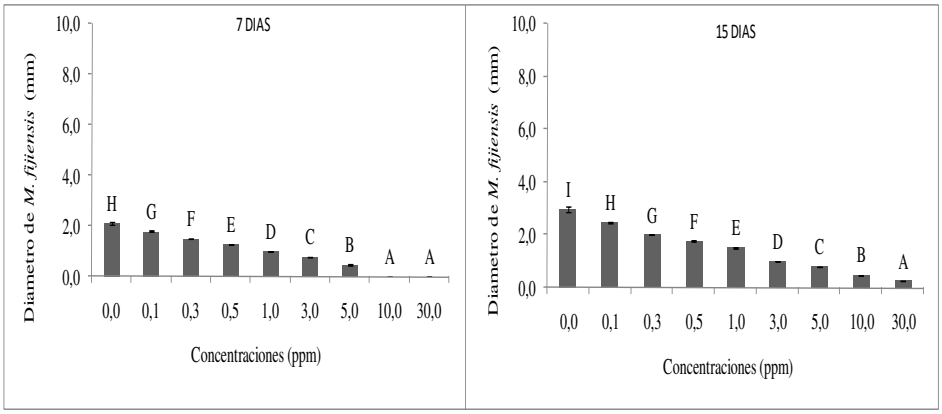


**Gráfico 6.3.5** Efecto del extracto de Neem, esterilizado por filtración, sobre el diámetro de colonias (mm) en evaluaciones realizadas a los siete y quince días. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

En el gráfico 6.3.6 se observa el porcentaje de inhibición de 91.61% en las dosis de 30 ppm. Su dosis letal media (DL50) es 1,03ppm.

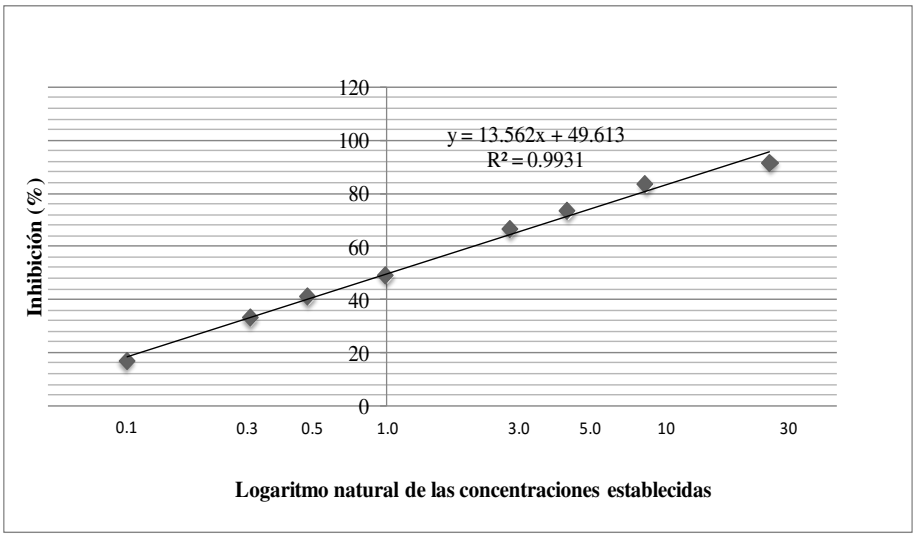


**Gráfico 6.3.6** Análisis de la relación entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo natural de la dosis con el extracto de Neem por el método de filtración.

En el gráfico 6.3.7 se observa que con el producto a base de extractos de cítricos por el método de autoclave (calor) y por filtración (frío), para ambos casos en el control hubo mayor crecimiento del diámetro de las colonias, mientras que en las concentraciones 0.3 - 30.0 ppm no se observó crecimiento.

Con el producto a base de extractos de neem por el método de filtración (frío), se observó un crecimiento inferior en las concentraciones de 3.0 - 30.0 ppm siendo estadísticamente iguales, lo contrario sucede en el control y la concentración 0.1 ppm, es decir existe mayor diámetro en promedio respecto a los otros tratamientos; en el extracto de neem por el método de autoclave (calor) se observó un menor crecimiento en las

concentraciones mas altas, presentando una mayor significancia la concentración 30.0 ppm que en general el efecto fue menor.

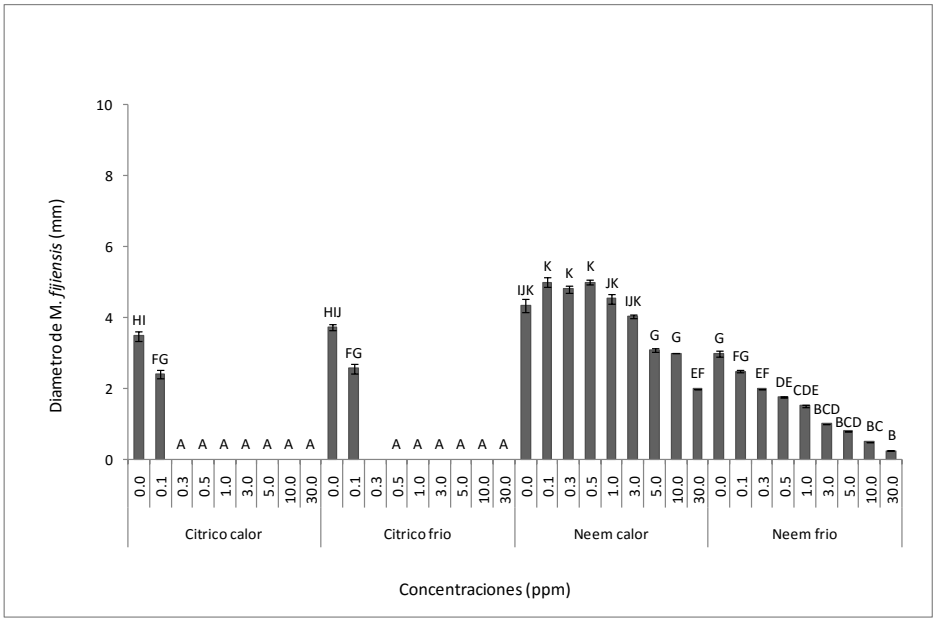


**Gráfico 6.3.7** Efecto del extracto de cítricos y extractos de neem, esterilizado por autoclave, sobre el diámetro de colonias (mm) en evaluaciones realizadas a los quince días. Letras diferentes, indican diferencias estadísticas significativas al 5%.

# DISCUSIÓN

Cabe acotar que los productos son comerciales y los resultados obtenidos con cada uno de los productos no tienen ningún tipo de similitud.

En el presente estudio se utilizo dos métodos de esterelizacion: por filtración y por autoclave, se pudo observar que en los ensayos que se utilizo el método por filtración hubo una disminución en su crecimiento uniforme del hongo M. fijiensis, debido a que los compuestos o moléculas pueden tener un efecto directo ya que el extracto al pasar por el filtro durapore® de 0.22um limita el paso de partículas, bacterias y hongos garantizando el medio de cultivo.

En el método por autoclave se observo crecimientos irregulares en las diferentes dosis debido a que el producto al estar con el medio de cultivo a altas temperaturas, físicamente los compuestos son termolábiles deteriorando la composición química de varios elementos

como compuestos o moléculas volviéndose termosensibles y afectando la actividad del producto.

Sin embargo hay estudios realizados en condiciones *in vitro* utilizando diferentes tipos de extractos de vegetales, dándoles muy buenos resultados para el control de Sigatoka negra y su agente causal *M. fijiensis.* Se nombran algunos de estos ensayos:

El extracto alcohólico de *Senna reticula* (Fabaceae) presentó la mayor actividad protectora *in vitro* contra la sigatoka negra y los posibles metabolitos secundarios responsables de esta actividad están relacionados con polifenoles, coumarinas, quinonas, saponinas, triterpenos y/o flavonoides [106].

Se demostró que los extractos de Momordica charantia (Cucurbitaceae) mostraron actividad *in vitro* contra *M. fijiensis* [111].

Se analizaron el efecto de 20 extractos etanólicos sobre el crecimiento y desarrollo de las ascosporas y colonias de *M. fijiensis* y encontraron que los más potentes fueron los de *Commelina difusa*, *Momordica charantia*, *Pavonia* sp., *Plenax* sp., *Piper hispidum*, *Piper peltatum*, *Sida*

*rhombifolia* y *Sysygium aromaticum*. De estos, el extracto que mostró la máxima actividad fue el de *S. aromaticum* [120].

En el estudio del efecto de tres extractos vegetales se observó su efecto positivo sobre la incidencia y severidad de la Sigatoka negra con el tratamiento extractos de *Heliotropium indicum* + *Ricinus comunis* [144].

# CAPÍTULO 7

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

### 7.1. Conclusiones

1. Tanto los productos a base de extractos de neem como los de extractos de cítricos tuvieron mayor efecto a mayor concentración tanto el uno como el otro.

2. El efecto de los productos a base de extractos de neem y extractos de cítricos inhiben a *M. fijiensis* directamente proporcional.

3. La dosis letal media (DL50) del extracto de neem es de 1.03 ppm por el método de filtración.

4. En el extracto de cítricos la dosis letal media (DL50) se encuentra entre las dosis 0.1 y 0.3ppm.

5. El producto a base de extracto de cítricos, causó mayor efecto de inhibición del hongo en el crecimiento de colonias, biomasa hifal, y germinación de ascosporas del hongo *M. fijiensis* que el extracto a base de neem

**7.2. Recomendaciones.**

1. Realizar ensayos con el hospedero en condiciones semicontroladas (invernadero) tomando en cuenta la dosis letal media (DL50).

2. Realizar con el extracto de neem ensayos tomando en cuenta la dosis letal media (DL50)

3. Validar en campo los resultados obtenidos bajo condiciones semicontroladas (invernadero) utilizando las concentraciones que tuvieron buenos resultados.

4. Realizar ensayos en el campo en zonas geográficas que presenten alta humedad relativa y temperatura elevada.

# APÉNDICES

# APÉNDICE I

## I. Listado de materiales y equipos requeridos para el desarrollo de la fase experimental.

**Equipo de Laboratorio**

Agitador

Agitador Vortex

Autoclave

Balanza electrónica

Cámara fotográfica

Cámara de flujo laminar

Estufa

Incubadora

Microscopio invertido y de Luz

Estereo microscopio

Hornilla eléctrica

Membraba Durapore® de 0.22 um

Bisturí

Hojas de bisturí

**Materiales de vidrio**

Matraces de Erlenmeyers

Pipetas

Vasos de precipitación

Cajas Petri

**Materiales varios**

Algodón

Cajas Petri plásticas

Espátulas

Etiquetas autoadhesivas

Gasa

Marcadores rotuladores

Medidor de pH

Papel de pH

Papel filtro

Papel aluminio

Pinzas

Regla

**Sustancias y reactivos**

Agua destilada

Alcohol

Dextrosa

Hidróxido de Sodio

Papa

Solución Tween

V8

PDA

# BIBLIOGRAFÍA


1. Aboellil, A.H, 2007. Trilogy, a Product of Neem (*Azadirachta indica*) Induces Resistance in Cucumber *Against Podoshaera xanthii.* Res. J. of Microbiol 2(5):402-414.

2. Agronotas, 2001. Situación actual del banano en el trópico. Disponible en: www.dupont-agricola.com (Visitado en Agosto del 2008).

*3.* Albert, F. and Anderson, A.J. 1987. The effect of *Pseudomonas putida* colonization on root surface peroxidase. Plant Physiology 85:535-541.

4. Álvarez JM, Beltrán A. 2003 Tecnología de producción con altas densidades en bananos y plátanos en Cuba y avances hacia

una producción orgánica. En: Rivas G, Rosales F (Eds.) Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas en los trópicos. MUSALAC, INIBAP. Guayaquil, Ecuador. pp. 65-66.

5. Anderson, A.J. and Guerra, D. 1985. Response of bean the root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system. Phytopathology 75:992-995.

6. Apostol, I., Heinstein, P.F. and Low, P. S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Plant Physiology 90:109-116.

7. ApSnet, The American Phytopathological Society. 2006. Sigatoka Negra: Ciclo de la Enfermedad y Epidemiologia. Disponible en: www.apsnet.org (Visitado en Diciembre del 2008).

8. Arias, P., Dankers, C., Liu, P. y Pilkaukas. 2004. La Economía Mundial del Banano 1985-2002. FAO Commodity Studies – 1.97p.

9. Atkinson, M. M. 1993. Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants. Advances in Plant Pathology 10:35-64.

10. Awad, N.G.H, 1990. Studies on tomato wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. Lycopersci. Ph.D. Thesis, Fac. Agric., Zagazig University, Egypt.

11. Bajpal, P.D. and Sundara Rao, W.V.B. 1971. Phosphate solubilising bacteria. III. Soil inoculation with phosphorus solubilising bacteria. Soil Science and Plant Nutrition 17:46-53.

12. Belalcázar CS, Rosales FE, Espinosa MJ. 2003 Altas densidades de siembra en plátano, una alternativa rentable y sostenible de producción. En: Rivas G, Rosales F (Eds.) Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas en los trópicos. MUSALAC, INIBAP. Guayaquil, Ecuador. pp. 55-63.

13. Benner, J.P. 1996. Crop protection agents from higher plants. An overview. p. 217-229. Chapter 6, Part. 1. In Copping, L.G.

(ed.). Crop protection agents from nature: natural products and analogues. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.

14. Bennett, R., and Phil, A., 2005. Sigatoka negra. Cornell University. Disponible en: http://www.apsnet.org (Visitado en Julio del 2009).

15. Ben-Yehoshua S., Rodov V., Kim J.J. and Carmeli S. 1992. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40:1217-1221.

16. Beresford, R.; Pak, H.; Brown, G.; Follas, G. and G. Hagerty. 1999. Strategies to Avoid Resistance Development to Strobilurin and Related Fungicides in New Zealand. Proc. 52nd N. Z. Plant Protection Conf.:179-181.

17. Bina, S.F. Siddiqui, T. Afshan, and H. Muddasar, 2004. Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica.* Phytochem., 65(16): 2363-2367.

18. Bradley, D.J., Kjellbom, P. and Lamb, C.J. 1992. Elicitor and woundinduced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. Cell 70:21-30.

19. Brederode, F.T., Linthorst, H. J. M. and Bol, J. F. 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. Plant Molecular Biology 17:1117-1125.

20. Brent, K .1995. Fungicide resistance in crops pathogens: St Raphael, Norton Lane, United Kingdom Conf.: 48 p.

21. Broadbent, P., Baker, K. F., Franks, N. and Holland, J. 1977. Effect of *Bacillus sp.* on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. Phytopathology 67:1027-1034.

22. Brown, M. E. 1972. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. Journal of Applied Bacteriology 34:443-451.

23. Buss, E.A.; Park-Brown, S.G. 2002. Natural products for insect pest management. Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Florida, US. Disponible en http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN19700.pdf (Visitado en Septiembre del 2008).

24. Castillo, J. 2004. Determinación de metabolitos secundarios en plantas silvestres del Parque Nacional Terepaima, municipio Palavecino, estado Lara. SABER. 17: 280-282.

25. Carlier, J., Foure, E., Gauhl, F., Jones, D., Lepoivre,p., Mourinchon, X,. Pasberg-Gauhl,. C. and Romero. 2000. Fangal Disease of foliage. In: Jones D. (ed) Disease of Banana, Abaca and Ensete. CAB international. UK pp37-39.

26. Chong P. 2007. “Diversidad genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet provenientes de haciendas bananeras con manejo orgánico y convencional”. ESPOL-Tesis de grado para la obtención de magister en biotecnología agrícola.

27. Collinge, D. B., Gregersen, P. L. and Thordal-Christensen, H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In: A. S. Basra, ed. Mechanisms of plant growth and improved productivity: modern approaches and perspectives. pp 391-433. Marcel Dekker, New York.

28. Cordero, M; González, S. 1988. El control químico de la Sigatoka negra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas, Venezuela. 15 p.

29. Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). In Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (Editors). American Society of Plant Physiologists. Rockville, US. p. 1250-1318.

30. Dekker, J. 1982. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: Center for Agricultural Publishing and documentation, P. 1-15.

31. Devlin, W. S. and Gustine, D. L. 1992. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. Plant physiology 100:1189-1195.

32. Duke, S.O. 1990. Natural pesticides from plants. *In* Advances in New Crops. Janick, J.; Simon, J.E. (Editors). Timber Press. Portland, US. p. 511-517.

33. Eeswara, J.P, E.J. Allan, and A.A. Powell. 1998. The influence of storage of seed maturity, moisture content and storage temperature on the survival of Neem (*Azadirachta indica*) seed in storage. Seed Sci. and Technol., 26(2): 299- 308.

34. Ehrlich, P.; Raven, P. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. Evolution 18: 586-608. Disponible en: http://www.blackwellpublishing.com/ridley/classictexts/elrich1.pdf (Visitado en Agosto del 2008).

35. Extractos vegetales, características de las plantas. Disponible en:http://www.bioext.com/extractos_vegetales.php (Visitado en Enero del 2008).

36. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT), 2004. El futuro de la agricultura depende de la biodiversidad. Disponible en: http://www.fao.org/newsroom/es/focus/2004/51102/index.html (Visitado en Enero del 2009).

37. FAO. 2005. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture data base. Disponible en: http://faostat.fao.org. (Visitado en Mayo 2009).

38. Farías-Larios, J., Orozco-S., M., y Guzmán-G., S. 1994. Control químico de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plátano Cv. Enano gigante con triazoles. XL Reunión Annual. Interamerican Society for Tropical Horticulture. Campeche, Campeche, México. P. 132.

39. Fawe A, Menzies JG, Cherif M, Bélanger RR, 2001. Silicon and disease resistance in dicotyledons. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndorfer GH, eds. Silicon in Agriculture. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 159–69.

40. Felix, G., Regenass, M. and Boller, T. 1993. Specific perception of subnanomolar concentration of chitin fragments by tomato cells: induction of extracelular alkalinization, changes in protein phosphorylation and establishment of a refractory state. Plant Journal 4:307-316.

41. Figueroa, Q.L. 1998. Bankit 25 SC (azoxystrobin) y Anvil 25 SC (hexaconazole) + Turbocharge como penetrante en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. En: Memorias de la XII Reunión ACORBAT Ecuador 98. Guayaquil, Ecuador. p. 400-401.

42. Flor, H. 1971. Currents status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. of Phytopathology 9: 275-296.

43. Frison, E., y Sharrock, S. 2000. Biodiversidad y producción sostenible del banano. La importancia de los bananos y plátanos. Disponible en: http://www.banafair.de (Visitado en agosto del 2009).

44. Galileo Rivas y Franklin Rosales. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas

asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos Actas del Taller" Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas", celebrado en Guayaquil,Ecuador. 11- 13 de agosto, 2003. INIBAP.

45. Ganguly, L.K. 1994. Fungitoxic effect of certain plant extracts against rice blast and brown spot pathogen. *Enviro. and Ecol.*, 12(3): 731-733.

46. García, L., Herrera, L., Bermúdez, I., Veitía, N., Clavero, J., Acosta, C. Y Romero, C. 1997. Metodología para la Selección In Vitro de *M. fijiensis* en banano. INIBAP, red International para el Mejoramiento del Banano y del Plátano. 6: 14-15.

47. Gascho, G. J. 2001. Silicon sources for agriculture. In: Datnoff, L. E., Snyder, G. H. y Korndorfer, G. H. (eds.), Silicon in agriculture. Georgia-USA: Elsevier, 12:197-201.

48. Gauhl F (1994) Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) on plantain and banana (*Musa* spp.) in Costa Rica, Central America. 120pp. The International Network

for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France.

49. Georgopoulus, S.G. 1995. The genetics of fungicide resistance. Modern selective fungicides. Properties Applications, mechanisms of action. Ed. By H Lyr. P. 23-38.

50. González, R. 1995. Effect de microorganismos quitinoliticos en el desarrollo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Tesis MSc, CATIE, Turrialba, C.R. 94 p.

51. Grayer R.J. & J.B. Harborne. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. Phytochemistry. 37(1): 19-42.

52. Gullino, M.L. 1998 Uses and Challenges with Novel Fungicides for Plant Disease Control. 7th International Congress of Plant Pathology. Scotland 9-16 Aug. Paper nº 5.6.1S:2p.

53. Guzmán, M. 2002. Situación de la Sigatoka en Costa Rica y Opciones para el Manejo de la Enfermedad. En: Memorias

(PROCEEDINGSMEMOIRES). 184-191. XV Reunión Internacional ACORBAT. Cartagena de Indias, Colombia.

54. Hahlbrock, K. and Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenyl-propanoid metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40:347-369.

55. Harvey, A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discovery Today 5(7): 294-300. Disponible en: http://www.ibmb.uni.wroc.pl/prace2/praca18.pdf (Visitado en Junio del 2008).

56. Heinrich, M.; Bames, J.; Gibbons, S.; Williamson, E.M. 2004. Phytotherapy and pharmacognosy. *In* Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone. Edinburgh, GB. p. 4-21.

57. Henriques W, Jeffers RD, Leacher TE Jr, Kendall RJ (1997) Agrochemical use on banana plantations in Latin America: perspectives on ecological risk. Environmental Toxicology and Chemistry 16:91-99.

58. Hernanadez, R. 2001. Nutricion Mineral de las Plantas. Libro Botanica OnLine. Disponible en: www.forest.ula.ve/~rubenhg/nutricionmineral (Visitado en Enero del 2008).

59. History of citrus. Disponible en http://ezinearticles.com/?History-Of-Citrus&id=270715 (Visitado en Octubre del 2008).

60. IFOAM, 2002. Training Manual for Organic Agricultura in the Tropics.pp112.

61. INEC, (Instituto Nacional de Estadisticas y Censos). Disponible en:http://www.inec.gov.ec/web/guest/descargas/basedatos/inv_eco/espac?doAsUserId=W9NEZWtSVLU%253D (Visitado en mayo del 2009).

62. Israeli, Y., Lahav, E. y Reuveni, O. 1995. In Vitro Culture of Bananas. Bananas and Plantains. First edition. S. Gowen (ed.). Chapman and Hall (eds). Great Britain. 147-165.

63. J. Niño, Y.M. Correa and O.M. Mosquera. 2006. “Antibacterial, antifungal, and cytotoxic Activities of 11 Solanaceae plants from Colombian biodiversity”. Pharmaceutical Biology. 44: 1-5.

64. Jácome, L., and Wshuh. 1992. Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. Difformis. Phytopathology 82 (5): 515-520.

65. Jiménez, M. 2008. “Effect of the nutritional status of Banana (*Musa spp.)* on leaf disease infestation by *M. fijiensis* Morelet in Ecuador”. Tesis para la obtención del grado de doctora en Bioingeniería.

66. Jones, D. R. 2000. Introduction to Banana, Abacá and Enset. Pages 1-30 in: Disease of Banana, Abaca and Ensete. D. Jones ed. CAB International, Wallingford UK.

67. Jones, L. H. P. and Handreck K. 1969. Silica in soils, plants and animals. Adv. Agron. 19:107-149.

68. Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. and Ryals, J. 1994. Induction of systemic acquired resistance an plants by chemicals. Annual Review of Phytopathology 32:439-459.

69. Kishore, G.K., S. Pande, and J.N. Rao, 2001. Control of late leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea*) by extracts from non-host plant species. Pla. J. Pathol., 17(5): 264-270.

70. Kloepper, J. W. and Schroth, M. N. 1981. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. Phytopathology 71:590-592.

71. Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growthpromoting rhizobacteria. Nature 286:885-886.

72. Kurihara, N.; Miyamoto, J.; Paulson, G.D.; Zeeh, B.; Skidmore, M.W.; Hollingworth, R.M.; Kuiper, H.A. 1997. Chirality in synthetic agrochemicals: Bioactivity and safety consideration. Pure and Applied Chemistry 69(6): 1335-1348.

73. Labbe, C. 1996. Química de Productos Naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Conf.

74. Langdon PW, Whiley AW, Mayer RJ, Pegg KG, Smith MK (2008) The influence of planting density on the production of 'Goldfinger' (*Musa* spp., AAAB) in the subtropics. Scientia Horticulturae 115:238-243.

75. Leonard, K.1984. Populations genetics of gene for gene interaction between plant host resistance and pathogen virulence oxford and IBM. Public. Co. pp131– 148.

76. Lepoivre, P., Busogoro, J., Etame, J., El Hadrami, A., Carlier, J., Harelimana, G., Mourichon, X., Panis, B., Riveros, A., Sallé, G., Strosse, H. and Swennen, R. 2003. Banana *Micosphaerella fijiensis* interaction. In: *Micosphaerella* leaf spot disease of banana. San Jose, Costa Rica. p151-159.

77. Liang, Y., Sun, W. and Romheld, V. 2005. Effects of Foliar and Root Applied Silicon on the Enhancement of Induced Resistance to Powdery Mildew in *Cucumis sativus.* Plant Pathology. 54: 678 – 685.

78. Lindsay, W. L. 1979. Chemical equilibria in soil. John Wiley & Sons, New York. Conf.

79. Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995a. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopatology 85:695-698.

80. Lovang, U, T. Wildt-Persson, 1998. Botanical pesticides. The effect of aqueous extracts of *Melia azedarach* and *Trichilia emetica* on selected pathogens of tomato, bean and maize. Minor-Field-Studies International Office, Swedish University of Agricultural Sciences, 52: 23.

81. Ma, J.F., Tamai, K., Ichii, M., and Wu, G.F. 2002. A rice mutant defective in Si uptake. Plant Physiology, 130: 2111-2117.

82. Madrigal A. 1998. CGA Z45704, a new plant activator to improve natural resistance of banana against black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis)*. Pp. 266- 274 in Proceeding XIII ACORBAT Meeting, Guayaquil, Ecuador.

83. Manejo de los plaguicidas botánicos. Disponible en: http://www.colprocah.com/docsPDF/Secciones/ManejoPlaguicidas.pdf (Visitado en Noviembre del 2008).

84. Marín DH, Romero RA, Guzmán M, Sutton TB. 2003. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. Plant Disease 87:208-222.

85. Marín, D y Romero, R. 1992. El combate de la Sigatoka negra. En: Boletin No. 4 Departamento de Investigaciones. CORBANA. San José. Costa Rica.

86. Martillo, Ch.E.E. 1998. Uso de Bankit (Azoxystrobin) en el Ecuador para el control de la Sigatoka negra. En: Memorias de la XII Reunión ACORBAT Ecuador 98. Guayaquil, Ecuador. p. 402-403.

87. Matichenkov, V. V. 1990. Amorphous oxide of silicon in soddy podzolic soil and its influence on plants. Author reference of Can. Diss., Moscow State University.

88. Mehdy, M. C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiology 105:467-472.

89. Mendelsohn, R.; Balick, M.J. 1995. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. Economic Botany 49(2): 223- 228.

90. Mengel, K. and Kirby, E. A. 1982. Principles of Plant Nutrition. Publication of the International Potash Institute, Berne, Switzerland.

91. Meredith D.S., Lawrence J. 1969. “Black leaf strike disease of banana (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii and notes on the conidial state of the casual fungus.” Transacciones de la Sociedad Británica de Micología. 52: 559-476.

92. Merrimann, P. R., Price, R. D., Baker, K. F., Kollmorgen, J. F., Piggott, T. and Ridge, E. H. 1975. Effect of *Bacillus* and *Streptomyces sp.* applied to seed. pp 130-133. In: G. W. Bruehl (eds.), Biology and control of soildborne plants pathogens. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota. 216p.

93. Miranda, J.E. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), colocados en el interior y exterior de la planta de banano. Tesis MSc., Catie. Turrialba, C.R.

94. Mobambo, N., Gauhl, F., Vulsteke, D., Ortiz, R., Gauhl, C., Swennen, R., 1993. Yield loss in plantain from black Sigatoka leaf spot and field performance of resistant hybrids. Field Crops Res. 35, pp 35-42.

95. Moraes, S., Pozza, E., Alves, E., Pozza, A., Carvalho, J., Lima, P y Botelho, A. 2005. Efeito de Fontes de Silicio na Incidencia e na Severidade de Antracnose de feijoeiro. Fitopatologia Brasileira. 31: 69-75.

96. Mourichon, X., y Fullerton, R. 1990. Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (Cercospora musae) and *M.fijiensis* Morelet (C.fijiensis ), respectively, agents of Sigatoka disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. Fruits 45: 213- 218.

97. Nicholson, R. L. and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolc compounds and their role in disease resistance. Annual Review of Phytopathology 30:369- 389.

98. Novillo, F. y Romero, J. 2001. Indicadores de la Actividad Bananera en el Ecuador. Guayaquil, Ecuador.

99. Nwachukwu, E.O. and C.I. Umechuruba, 2001. Antifungal activities of some leaf extracts on seed-born fungi of African yam bean seeds, seed germination and seedling emergence. J. Appl. Sci. and Enviro. Manag.,5(1): 29-32.

100. Orozco-Romero J, Orozco-Santos M, Pérez-Zamora O (2004) Diagnóstico y recomendación nutricional y de riego para banano en el trópico seco de México. Publicación especial de la XVI Reunión ACORBAT 2004. Oaxaca, México. pp. 137-142.

101. Orozco-Santos M. 1998. Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. Folleto técnico No. 1. División Agrícola. 95 p.

102. Orozco-Santos M, Farías-Larios J, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S. 2002. Manejo integrado de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) del banano en el trópico seco de México. Memorias de la XV Reunión ACORBAT 2002. Cartagena de Indias, Colombia. pp. 119-124.

103. Orozco-Santos M, Orozco-Romero J. 2006. Manejo sustentable de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano: conocimiento del patosistema, prácticas culturales y control químico. Memorias de la XVII Reunión ACORBAT 2006. Joinville, SC, Brasil. pp. 100-116.

104. Orozco-Santos, M., Farías-Larios, J., Manzo-Sánchez, G., and Guzmán, González, S. 2001. Black Sigatoka disease (*Mycosphaerella fijiensis*) in México. INFOMUSA 10(1):33-37.

105. Osbourn A.E. 1996. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attak. Plant Cell. 8:1821-1831.

106. Osorio-Salamanca. 2006. “Evaluación de hongos endofíticos y extractos botánicos para el control de la Sigatoka negra

(Mycosphaerella fijiensis Morelet) en banano". CATIE – Tesis de Grado, Costa Rica.

107. Paasche, E. 1980. Silicon. p. 259–284. In The Physiological Ecology of Phytoplankton, ed. by I. Morris, Univ. California Press, Berkeley and Los Angeles.

108. Patil, M.J, S.P. Ukey, and B.T. Raut, 2001. Evaluation of fungicides and botanicals for the management of early blight (*Alternaria solani*) of tomato. PKV-Research Journal, 25(1): 49-51.

109. Pérez, L y Pérez, M., 2002. Peca de la hoja de los plátanos por *Ramichloridium musae Stahel* ex de *Hoog*: Primer informe en Cuba. Fitosanidad 6 (1): 11-13.

110. Pitman, N.; Jorgensen, P. 2002. Estimating the size of the world's threatened flora. Science 298(5595): 989.

111. Polanco, A.S. Riveros and M.Guzman. 2004. "Uso de productos botánicos para el control de la Sigatoka negra en banano: una tecnología limpia". En: Memorias (Eds. GTZ & CANIAN).

Congreso Latinoamericano de Bioplaguicidas y Abonos Orgánicos. Impreso en medio magnético. San José de Costa Rica.

112. Price, N. S. 1995. Banana Morphology – Part I: Roots and Rhizomes. In: Bananas and Plantains. First Edition. 179-183. S, Gowen (ed.) Chapman,and Hall (eds.). Glasgow, Great Britain.

113. Quito, D.F. 2007. 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). ESPOL – Tesis de Grado, Ecuador.

114. Ramírez, S.G. y Rodríguez, C.J.C. 1996. Manual de producción de plátano para Tabasco y Norte de Chiapas. INIFAP, CIRGOC, Campo Experimental Huimanguillo. Huimanguillo, Tabasco, México. 80 p.

115. Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzon, S. and Kloepper, J. W. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant

growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Plant Disease 80:891-894.

116. Rausher, M. 2001. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. Nature 411: 857-864.

117. Reigart, J.; Roberts, J. 1999. Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas. 5 edición. (en línea). Environmental Protection Agency (EPA). Washington, US. Disponible en: http://www.epa.gov/oppfod01/safety/spanish/healthcare/handbook/contents.htm (Visitado en julio del 2008).

118. Rivas G, Zapater M, Abadie C and Carlier J. 2004. "Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas "*Mycosphaerella fjiensis*". Molecular Ecology. Volumen 13 (2): 471.

119. Rivas, G., y Rosales, F. 2003. Actas del taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra, nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas", celebrado en Guayaquil, Ecuador. 11- 13 de agosto.

120. Riveros and A.M. Arciniegas. 2003. “Productos naturales como biofungicidas e inductores de resistencia para el manejo de la Sigatoka negra” En: G. Rivas y F. Rosales, editores. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos celebrado en Guayaquil, Ecuador. INIBAP. 31-32.

121. Rovira, A. D. 1972. Studies on the interactions between plant roots and microorganisms. Journal of the Australian Institute of Agriculture Sciences 38:91-94.

122. Rowe y Rosales. 1994. Musa breeding at FHIA. In The improvement and testing of musa: a global parnertship. DR Jones ed. INIBAP, Parc Scientifique Agropolis, Montpellier, France, p 117-129.

123. Rowe, P. 1998. Mejoramiento de banana y plátano resistentes a plagas y enfermedades. Rosales, F.E; Tripton, S.C. y Cerna eds. 1999. Producción de banano orgánico y, o, ambientalmente amigable. Memorias de taller internacional

realizado en la EARTH, Guácimo. Red internacional para el mejoramiento del banano y el plátano, Montpellier, Francia.

124. Sangster, A. G. and Hodson, M. J. 1986. Silica and higher plants. pp. 90- 111. In: Evered, D. and O´Connor, M. (eds.), Silicon biochemistry, Ciba Found Symp. 121, Wiley, Chichester, U. K.

125. Schmelzer, E., Kruger-Lebus, S. and Hahlbrock, K. 1989. Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. The Plant Cell 1:993-1001.

126. Schmutterer, H. 1995. The Neem Tree *Azadirachta indica* (*A. Juss*). and Other *Meliaceous* Plants. VCH Verlagsellchaft Publ. Weinheim, New York, Cambridge, Tokyo.

127. Schroder, M., Hahlbrock, K. and Kombrink, E. 1992. Temporal and spatial patterns of 1,3-β-glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by Phytophthora infestans. Plant Journal 2:161-172.

128. Seebold, K., Kucharek, T; Datnoff, L, Correa-Victoria, F y Marchetti, M. 2001. The Influence of Silicon on Components of Resistance to Blast in Susceptible, Partially Resistance and resistance Cultivars of Rice. Phytopathology. 91: 63-69.

129. Shillingford, C.A. 1990. Use of systemic fungicides to control leaf spot disease in Musa. p. 75-83. In: Fullerton, R.A. and Stover, R.H. (Eds.). Sigatoka leaf spot diseases of bananas. Proceeding of an international workshop. INIBAP. San José, Costa Rica. p. 374.

130. Simmonds, N. y Shepherd, K. 1955. Taxonomy and origins of cultivated bananas. London, UK. Journal of the Linneaen Society of Botany 55:302-312.

131. Singh, H.N, M.M. Prasad, and K.K. Sinha, 1993. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease development in banana. Lett. in Appl. Microbiol., 17(6): 269-271.

132. Somssich, I. E., Bollmann, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E. and Schulz, W. 1989. Differential early activation of defense-related

genes in elicitortreated parsley cells. Plant Molecular Biology 12:227-234.

133. Srivastava, A.K, B. Bihari, B. Lal, 1997. Studies on biofungicidal properties of leaf extract of some plants. Indian Phytopathol., 50(3): 408-411.

134. Stover, R.H. 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. Plant Disease 64:750-755.

135. Stover, R. and Simonds, N. 1987. Bananas. Longman Scientific and Technical. 3th ed. England. 467 p.

136. Stover, RH,; Dickson, J.D. 1976. Banana leaf spot caused by *Mycospharella musicola*: methods of measuring spotting prevelance and severity. Tropical Agriculture 47, 289-302.

137. Suquilanda, M. 2001. “Manejo Alternativo de Sigatoka Negra”. Cultivos Controlados. Volumen 3 # 5.

138. Talavera Sevilla, M.E. 1996. Determinación de glucano en subproductos agrícolas y evaluación del efecto de

microorganismos gluconoliticos sobre *Mycosphaerella fijiensis* en banano. CATIE-Tesis MSc. Costa Rica.

139. The American Phytopathological Society. 2005. Elaborado a partir de CARLIER J. 1994. ”Estudio de poblaciones, mediante RFLP, de Mycosphaerella fijiensis, agente responsable de la enfermedad de rayas negras en bananos”.

140. Theis, N.; Lerdau, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. International Journal of Plant Sciences 164(3): S93-S102.

141. Vallejo, S. 2002. Perfil del Sector Agropecuario Ecuatoriano 2002. IICAEcuador, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. pp1-11.

142. Van der Veken, L. 2004 Black Sigatoka in banana: options from organic agricultura.

143. Van Peer, R., Niemann, G. J. and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of

Fusarium wilt of carnation by Pseudomonas sp. Strain WCS417r. Phytopathology 81:728-7334.

144. Vargas, J.L. 2008. “Evaluación del efecto de tres extractos vegetales sobre la Sigatoka negra, el desarrollo y la producción, en el cultivo del plátano (*Musa* AAB cv. Hartón)”. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Venezuela.

145. Vázquez, V., Perez, M. y Orozco, J. 2004. Evaluación de Cultivares de Plátano Tolerantes a Sigatoka Negra en Nayarit. En: Publicación Especial de ACORBAT. 225. XVI Reunión Internacional ACORBAT. Oaxaca, México.

146. Von Woedtke T, Schulter B, Pflegel P, Lindequist U. and Julich W.D.1999. Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. Pharmazie, 54 (6): 452-456.