

ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD PUNTA DE CIGARRO EN PLANTACIONES DE
BANANA EN LAS PROVINCIAS DE SALTA Y JUJUY

Claudio Manuel Ortiz

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar el título de
MAGISTER EN CIENCIAS AGRARIAS

ORIENTACIÓN EN FITOPATOLOGÍA

AREA PRODUCCIÓN VEGETAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP-
Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA

Balcarce, Argentina

Marzo 2017

ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD PUNTA DE CIGARRO EN PLANTACIONES DE
BANANA EN LAS PROVINCIAS DE SALTA Y JUJUY

Claudio Manuel Ortiz

Comité Consejero

Ridao, Azucena del Carmen

Directora de Tesis

Clemente, Gladys Elena

Asesora

Bejarano, Noemí del Valle

Asesora

ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD PUNTA DE CIGARRO EN PLANTACIONES DE
BANANA EN LAS PROVINCIAS DE SALTA Y JUJUY

Claudio Manuel Ortiz

Aprobada por

Ridao, Azucena del Carmen

Directora de Tesis

Evaluador externo

Evaluador interno

Evaluador externo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de manera muy especial a mi hijo Vicente Manuel Ortiz Bravo, mi señora esposa Fernanda Gabriela Bravo, a mi madre Vicenta Patricia Torres, hermanos Marcelo Javier Ortiz, Jorge Daniel Ortiz, sobrinos y amigos de la localidad de Yuto. Ya que siempre estuvieron presentes en mi formación como persona.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en forma especial a mi comité asesor Directora: Dra. Azucena del Carmen Ridao, Consejeros: Gladys Elena Clemente y Noemí del Valle Bejarano. Y a quienes me ayudaron a realizar el trabajo: Ceferino René Flores, Héctor Rubén del Pino, Rosa Elina Rueda, Noelia Mabel Rueda, Alejandro Martin Ismael y a nuestra amiga y compañera Silvia Griselda Bejarano que estará siempre con nosotros. Como también extendiendo este agradecimiento al grupo de Patología Vegetal de EEA INTA Balcarce y a la EECT de Yuto por permitirme formar académicamente.

No quiero dejar de mencionar a los nuevos amigos que encontré en esta estadía de la carrera, ya que estuvieron en los buenos y malos momentos para brindarme su sincera amistad.

ÍNDICE

Indice de Tablas	viii
Indice de Figuras	ix
Resumen	xiii
Abstract	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivo general	2
1.2.1 Objetivos particulares	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Origen y Taxonomía del banano (<i>Musa spp.</i>)	3
2.2 Importancia mundial del cultivo	4
2.2.1 Los principales países productores a nivel mundial	5
2.2.2 Principales países Exportadores e Importadores	5
2.2.3 Importancia nacional	7
2.3 Descripción botánica	8
2.3.1 Aspectos generales	8
2.3.2 Morfología de las estructuras vegetativas	9
2.3.2.1 Sistema radical	9
2.3.2.2 Cormo	9
2.3.2.3 Yemas laterales (brotes, hijos o retoños)	10
2.3.2.4 Sistema foliar	13
2.3.2.5 Inflorescencia	13
2.3.2.6 Desarrollo de las flores	15
2.3.2.7 Desarrollo del fruto	16
2.4 Manejo Agronómico	18
2.5 La enfermedad punta de cigarro	19
2.5.1 Síntomas	19
2.5.2 Agentes causales	19
2.5.2.1 <i>Musicillium theobromae</i> (Turconi) Zare & W. Gams (sinónimo <i>V. theobromae</i> Turconi E.W. Mason & S. J. Hughes – <i>Stachylidium theobromae</i> Turconi)	19
2.5.2.2 <i>Fusarium spp.</i>	21
2.5.2.3 <i>Deightonella torulosa</i> (Syd) Ellis	22
2.5.2.4 <i>Trachysphaera fructigena</i> Tabor and Bunting	22
2.5.3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad	23
2.5.4 Manejo de la enfermedad	24
3. MATERIALES y MÉTODOS	25
3.1 Área de Muestreo	25

3.1.1 Método de muestreo	25
3.1.2 Recolección de Frutas	26
3.2 Aislamiento de hongos a partir de frutas con síntomas	27
3.3 Pruebas de Patogenicidad	28
3.4 Crecimiento <i>in vitro</i> y caracterización morfológica de los aislamientos fúngicos	30
3.4.1 Crecimiento <i>in vitro</i> a distintas temperaturas y caracterización morfológica macroscópica	30
3.4.2 Caracterización micromorfológica de <i>Fusarium</i> y <i>Musicillium</i>	31
3.4.3 Caracterización molecular de <i>Musicillium</i>	31
3.4.3.1 Extracción de ADN	32
3.4.3.2 PCR con primers específico para <i>V. dahliae</i>	32
3.4.3.3 PCR con ITS1/ITS4 y digestión con las enzimas <i>Hae</i> III e <i>Hinf</i> I	33
3.4.3.4 PCR para la detección del gen β -tubulina con Bt1a/Bt1b y digestión con las enzimas <i>Alu</i> I, <i>Hinf</i> I y <i>Cfo</i> I	34
3.4.3.5 Digestión con la enzima <i>Hae</i> III para el mDNA	34
3.4.3.6 Análisis multivariado de los resultados de las pruebas moleculares	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Área y método de muestreo: Prevalencia e Incidencia de la enfermedad	35
4.1.1 Aislamientos de hongos a partir de frutas con síntomas	36
4.1.2 Pruebas de Patogenicidad	37
4.2 Crecimiento <i>in vitro</i> y caracterización de los aislamientos fúngicos	41
4.2.1 Crecimiento <i>in vitro</i> a distintas temperaturas y caracterización macro y micromorfológica de <i>Fusarium</i> y <i>Musicillium</i>	41
4.2.2 Caracterización molecular de <i>Musicillium</i>	46
4.2.2.1 Extracción de ADN	46
4.2.2.2 PCR con primers específicos para <i>V. dahliae</i>	47
4.2.2.3 PCR con ITS1/ITS4 y digestión con las enzimas <i>Hae</i> III e <i>Hinf</i> I	48
4.2.2.4 PCR para la detección del gen β -tubulina con Bt1a/Bt1b y digestión con las enzimas <i>Alu</i> I, <i>Hinf</i> I y <i>Cfo</i> I	50
4.2.2.5 Digestión con la enzima <i>Hae</i> III para el mDNA	50
4.2.2.6 Análisis Multivariado	51
5. DISCUSIÓN	52
6. CONCLUSIONES	56
7. BIBLIOGRAFÍA	57
8. APÉNDICE	64
ANEXO I	64
ANEXO II	75
ANEXO III	76
ANEXO IV	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Incidencia (%) de punta de cigarro en nueve lotes de seis fincas de Jujuy y Salta donde apareció punta de cigarro (diciembre 2014/enero de 2015).	36
<hr/>	
Tabla 2: Código y origen de los aislamientos de <i>Fusarium</i>, <i>Musicillium</i>, <i>Colletotrichum</i> y <i>Alternaria</i>, usados en la primera prueba de patogenicidad.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

<p>Figura 1: Estadística de producción mundial de bananas entre 2012/2014. Fuente: FAOSTAT (2015). Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas. División de Estadística. _____</p>	5
<p>Figura 2: Principales países exportadores de banana en el periodo 2000/2013. Fuente: FAOSTAT (2016). Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas. División de Estadística. _____</p>	6
<p>Figura 3: Principales países importadores de banana en el periodo 2000/2013. Fuente: FAOSTAT (2016). Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas. División de Estadística. _____</p>	6
<p>Figura 4: Zonas de la producción de Banana en Argentina. Fuente Heit, 2009. _</p>	8
<p>Figura 5: Planta madre de banano con yema lateral (retoño o hijo de sucesión) e inflorescencia (Champion, 1963 - Tomado de Caballero Hernández, 2011) _____</p>	8
<p>Figura 6: Orden de aparición de los brotes en un cormo de banano. Los números del 1 al 6 representan el conjunto de brotes susceptibles de producir retoños. Los brotes aparecen en pentágonos sucesivos separados en 20 °. Fuente: Aubert, B. Fruits, (1973) modificado de De Langhe (1961). Figura tomada de Soto Ballester (2008). _____</p>	11
<p>Figura 7: Representación esquemática de desarrollo fenológico por fases de una planta de banano y su retoño (Soto Ballester, 2008). Referencias: Y: yema, desarrollo del sistema lateral; F10: primera hoja con 10 cm de ancho; Fm: primera hoja con relación foliar mínima; F: emisión de la flor; y C: cosecha del fruto. _____</p>	12
<p>Figura 8: Medidas sobre la inflorescencia en el interior del pseudotallo (después de la disección). HI: altura de la inflorescencia; LE: longitud de los entrenudos de las brácteas vacías; LI: longitud de la inflorescencia. Fuente: Lassoudière, 1978e en Fruits 33(7-8):492-503. _____</p>	14
<p>Figura 9: Crecimiento de la inflorescencia desde 4 días después de la floración hasta la cosecha. Fuente: Soto Ballester (2008). _____</p>	16
<p>Figura 10: a) Evolución del tamaño y forma del dedo central de la segunda mano desde cuatro días después de la floración. b) Evolución de la superficie transversal del fruto central de la segunda mano desde la floración hasta la cosecha. Fuente: Soto Ballester (2008). _____</p>	17
<p>Figura 11: Microfotografías de <i>Musicillium theobromae</i>. a-e, h, i, k-p. IRAN 930C, f, g, j. IRAN 452C. Imagen tomada de Zare <i>et al.</i> (2007). _____</p>	21
<p>Figura 12: Ilustración de <i>D. torulosa</i> a) conidióforos y b) conidios. Imagen tomada de Barnett y Hunter (1998). _____</p>	22

- Figura 13: Vesículas y esporangios de *Trachysphaera fructigena* formados en la vaina de cacao contaminada en laboratorio. Imagen tomada de Goujon (1965).** _____ 23
- Figura 14: Ciclo de la enfermedad conocida como punta de cigarro. Esquema propio realizado según la información bibliográfica.** _____ 24
- Figura 15: Zonas productoras de banana en las provincias de Salta y Jujuy. (Fuente: Imagen satelital tomada del google maps).** _____ 25
- Figura 16: Diagrama de muestreo por barrido, adaptado de Filho *et al.* (1985). Las flechas muestran el recorrido dentro del lote, saliendo del espacio entre dos filas (“melga” o “trocha”), dejando cinco filas sin muestrear, para reingresar nuevamente entre dos filas y continuar con el muestreo, hasta completar el lote. Se observa hacia ambos lados del recorrido, la presencia de frutas con síntomas las dos filas aledañas, las que se extraen para el aislamiento de patógenos.**__ 26
- Figura 17: Metodologías de inoculación en bananas sanas: 1a) Herida más algodón estéril húmedo, 1b) Herida más algodón estéril seco, 2a) Herida más alta humedad relativa, 2b) Herida con baja humedad relativa, 3a) Inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) Inoculación sin herida con baja humedad relativa.** _____ 29
- Figura 18: a) Racimo de bananas afectadas por punta de cigarro y b) Fruta de banana con síntoma de punta de cigarro. Imágenes propias, furtas que fueron recolectadas en un finca ubicada en la provincia de Salta donde se obtuvo el aislamiento de *Musicillium theobromae* F39C1**_____ 35
- Figura 19: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) por los aislamientos inoculados: F25C3a, F19C4, F6C6, F13C1, F16C4, F36C2, F2C1, F24C2b, F4C2b, F30C1, F20C4, F39C1, F*01C3b, F24C1, F12C2, F6C4, F35C2, F21C4 y Testigo 1 y 2.** _____ 38
- Figura 20: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) para las metodologías de inoculación: 1a) herida más algodón estéril húmedo, 1b) herida más algodón estéril seco, 2a) herida más alta humedad relativa, 2b) herida con baja humedad relativa, 3a) inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) inoculación sin herida con baja humedad relativa.**_____ 38
- Figura 21: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) por los aislamientos inoculados: F24C2b, F30C1, F6C6, F13C1, F2C1, F19C4, F16C4, Testigo, F39C1, F*01C3b y F20C4.** _____ 39
- Figura 22: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) para las metodologías de inoculación: 1a) herida más algodón estéril húmedo, 1b) herida más algodón estéril seco, 2a) herida más alta humedad relativa, 2b) herida con baja humedad relativa, 3a) inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) inoculación sin herida con baja humedad relativa.**_____ 39

Figura 23: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) por los aislamientos inoculados: F30C1, F24C2b, F6C6, F13C1, F19C4, F2C1, F16C4, F39C1, F20C4, F*01C3b y Testigo. _____ 40

Figura 24: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) para las metodologías de inoculación: 1a) herida más algodón estéril húmedo, 1b) herida más algodón estéril seco, 2a) herida más alta humedad relativa, 2b) herida con baja humedad relativa, 3a) inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) inoculación sin herida con baja humedad relativa. _____ 40

Figura 25: a) Banana con síntoma inoculada con el aislamiento F39C1. b) Conidióforos y fiálides (400x) de *Musicillium theobromae* tomados de la superficie de una fruta con el síntoma de punta de cigarro. c) Banana con necrosis producida por *Fusarium* y d) Frutas sin síntomas (control) del método 1a. Las imágenes a) y c) muestran frutas que fueron inoculadas por el método 2b. _____ 41

Figura 26: Tasas de crecimiento (cm/día) de los aislamientos estudiados en medio APD+cloranfenicol a temperaturas 16 °C, 23 °C, 27 °C y 35 °C. A) F19C4, B) F30C1, C) F2C1, D) F6C6, E) F24C2b, F) F13C1, G) F16C4, H) F39C1, I) F20C4 y J) F*01C3b. _____ 43

Figura 27: Anverso y reverso de los aislamientos fúngicos crecidos en APD durante 10 días a 23 °C. A) F24C2b: *Fusarium* sp., B) F2C1: *F. semitectum*, C) F6C6: *Fusarium* sp., D) F13C1: *F. oxysporum*, E) F16C4: *Fusarium* sp., F) F19C4: *F. verticillioides*, G) F30C1: *Fusarium* sp., *Musicillium theobromae* H) F39C1, I) F*01C3b, y J) F20C4. _____ 45

Figura 28: A) F2C1: *Fusarium semitectum*, a: conidióforo, b: macroconidios. B) F13C1: *F. oxysporum*, a: microconidios agrupados en falsas cabezas, b: microconidioforos. C) *F. verticillioides*, a: macroconidios septados, b: microconidios en cadenas. *Musicillium theobromae*: D) F*01C3b y E) F20C4: a: conidiofóro, b: fialides, y F) verticilos. Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento de 400x. _____ 46

Figura 29: Resultados de la electroforesis para evaluar la calidad del ADN extraído. Referencias: 1, 2, 13, 14 y 15, marcador λ DNA *Hind* III (1, 5, 2.5, 7.5 y 10 μl respectivamente); 3 a 12, extracciones de DNA: 3 y 4 aislamiento F*01C3b, 5 y 6 aislamiento F39C1, 7 y 8 aislamientos F20C4, 9 y 10 cepa Colón de *Verticillium dahliae*, 11 y 12 cepa de América de *V. dahliae*. _____ 47

Figura 30: Productos de reacciones con primers específicos para *Verticillium dahliae*. Referencias: 1, aislamiento F*01C3b; 2, aislamiento F39C1; 3, aislamiento F20C4; 4 y 5, cepa América de *V. dahliae*; 6, marcador 100 bp; 7 a 9, cepas de *V. dahliae*: cepas Orense, Bragado y Colón respectivamente; 10, control negativo de la reacción. _____ 48

Figura 31: Productos de PCR de reacciones con primers específicos para *Verticillium dahliae*. Referencias: 1 a 3, aislamiento F20C4 (ADN sin diluir, diluido

1/10 o 1/100 respectivamente); 4 y 5, cepa América de *V. dahliae* (ADN diluido 1/10); 6, control negativo de la reacción; 7, marcador 100 bp. _____ 48

Figura 32: Productos de PCR de reacciones con primers ITS 1 e ITS 4. Referencias: 1, aislamiento F*01C3b; 2, aislamiento F39C1; 3, aislamiento F20C4; 4 y 5, cepa América de *Verticillium dahliae*; 6, marcador 100 bp; 7, control negativo de reacción. _____ 49

Figura 33: Productos PCR con primers ITS 1 e ITS 4 y resultados de la digestión de esos productos. Referencias; 1 a 5, productos de PCR ITS1/ITS4: aislamientos F*01C3b, F39C1 y F20C4, cepa América de *Verticillium dahliae* y control negativo de reacción, respectivamente; 6 marcador 100 bp; 7 a 13, productos de digestión con *Hae* III, 14 a 20, productos de digestión con *Hinf* I: aislamientos F*01C3b, F39C1 y F20C4, dos cepas América de *V. dahliae*, control negativo de PCR ITS1/ITS4, control negativo de digestión respectivamente. __ 49

Figura 34: Productos de PCR del gen β -tubulina con primers Bt1a/Bt1b y productos de digestión. Referencias: 1 a 6, productos de PCR Bt1a/Bt1b: aislamientos F*01C3b, F39C1 y F20C4, dos cepas América de *Verticillium dahliae*, control negativo de reacción, respectivamente; 8 a 14 digestión con *Alu* I, 16 a 22 digestión con *Cfo* I, 24 a 30 digestión con *Hinf* I: aislamientos F*01C3b, F39C1 y F20C4, dos cepas América de *V. dahliae*, control negativo de PCR ITS1/ITS4, control negativo de digestión respectivamente; 7, 15 y 23, marcador 100 bp. _ 50

Figura 35: Productos de la digestión de mtDNA con *Hae* III. Referencias: 1, aislamiento F*01C3b; 2, aislamiento F39C1; aislamiento F20C4; 4 y 5, cepas América de *Verticillium dahliae*; 6 control negativo de reacción; 7, marcador 100 bp. _____ 50

Figura 36: Dendrograma de clasificación de los aislamientos según los resultados de la digestión con las ER *Hae* III e *Hinf* I sobre productos de PCR ITS 1 – ITS 4 y de las enzimas *Alu* I, *Cfo* I e *Hinf* I sobre PCR para β -tubulina. (Total de variable en el análisis multivariado: 12). _____ 51

RESUMEN

El cultivo del banano es una actividad de importancia económica en la región subtropical de las provincias de Salta y Jujuy, desarrollada desde hace más de 70 años. En los últimos años se ha observado en los frutos la presencia de “punta de cigarro”, enfermedad cuarentenaria del tipo A2 (Resol. ex SAGyP N°99/94). La bibliografía internacional cita entre sus posibles agentes causales a *Musicillium theobromae*, *Trachysphaera fructigena*, *Fusarium* spp. y *Deighthoniella torulosa*. El objetivo de este trabajo fue determinar para la región de Salta y Jujuy la prevalencia e incidencia de la enfermedad, aislar y caracterizar patológica, morfológica, cultural y molecularmente al/los agente/s causal/s. En el verano 2014/2015 se muestrearon completamente al azar por barrido, 363 ha de banano. Se colectaron 40 frutos con síntomas y se calculó la prevalencia e incidencia de la enfermedad. De 137 aislamientos monospóricos obtenidos, se inocularon a frutos sanos, tres aislamientos de *Musicillium*, diez de *Fusarium*, tres de *Alternaria* y tres de *Colletotrichum*. Se usaron los métodos: 1a) con herida y uso de algodón húmedo, 1b) con herida y uso de algodón seco, 2a) con herida y alta humedad relativa, 2b) con herida sin alta humedad relativa, 3a) sin herida y alta humedad relativa y 3b) sin herida y sin alta humedad relativa. Se estudiaron tres aislamientos patógenos (F*01C3b, F39C1, y F20C4) identificados macro y micromorfológicamente como *M. theobromae*. Se realizaron RFLPs de la región ITS1/ITS4 con *Hae* III y *Hinf* I, del gen β -tubulina con *Alu* I, *Hinf* I y *Cfo* I, y del mtDNA con *Hae* III. Como controles en las pruebas moleculares se usaron cepas de *Verticillium dahliae*, por su filogenia cercana al género *Musicillium*. La prevalencia promedio fue de 15 % (23.3 % en Jujuy y 6.9 % en Salta) y la incidencia promedio fue de 0.12 % y 0.05 % en Jujuy y Salta respectivamente. Los tres aislamientos resultaron patógenos con las metodologías que incluían la herida de frutos sin uso de algodón y se cumplió con los postulados de Koch. Los aislamientos rindieron bandas de 300 a 400 pb en la digestión de productos ITS. El aislamiento F20C4 amplificó con primers específicos de *V. dahliae*, pero sus RFLPs difirieron de los de este hongo. Solo el aislamiento F39C1 amplificó el gen β -tubulina y la restricción rindió bandas de 400 a 500 pb con *Alu* I, 300 a 400 pb con *Cfo* I y 500 a 600 pb con *Hinf* I. Ningún aislamiento rindió productos de digestión del mtDNA con la enzima *Hae* III. El análisis multivariado agrupó a los aislamientos estudiados en un mismo cluster, separados de los controles. Se discuten las limitaciones de los métodos moleculares abordados en este trabajo para su uso en la identificación del patógeno *M. theobromae*.

Palabras claves: *Musa* spp., *Musicillium*, *Musicillium theobromae*, aislamientos, RFLPs, PCR.

ABSTRACT

Banana cropping has been developed since more than 70 years ago and it has an economic importance at the subtropical region in Salta and Jujuy provinces. Last years the "cigar end rot" disease has been observed affecting bananas fruits (quarantine pest type A2, Ex SAGyP Resolution 99/94). The international bibliography cites the pathogens *Musicillium theobromae*, *Trachysphaera fructigena*, *Fusarium* spp. and *Deighthoniella torulosa* as responsible of this disease. The objective of this work was to determine the prevalence and incidence of the disease in Salta and Jujuy, isolating the causal agent/s, to characterize the pathogenicity and morphology of cultures, and to perform RFLP tests to identify the pathogens. At 2014-2015 summer season, 363 hectares were randomly scanned to collect 40 diseased fruits, recording the disease incidence and prevalence. From 137 monoconidial isolates, three *Musicillium* isolates, ten *Fusarium* isolates, three *Alternaria* isolates and three *Colletotrichum* isolates, were inoculated to healthy fruits. Different inoculation methods were used: 1a) wound and moist cotton pad, 1b) without wound and dry cotton pad, 2a) wound and wetness, 2b) wound and no wetness, 3a) without wound and wetness and 3b) without wound and no wetness. RFLPs of ITS1/ITS4 regions with *Hae* III and *Hinf* I enzymes, β -tubulin gene with *Alu* I, *Hinf* I and *Cfo* I and total mtDNA with *Hae* III enzyme were performed. The pathogenic isolates F*01C3b, F39C1 and F20C4 (identified as *M. theobromae* by macro and micro-morphology) were studied. Two strains of *Verticillium dahliae* were used as controls because their phylogenetic relationship with the *Musicillium* genus. The prevalence mean was 15 % (23.3 % for Jujuy, 6.9 % for Salta). The incidence mean was 0.12 % for Jujuy and 0.05 % for Salta. The three isolates fulfilled the Koch postulates, being pathogenic when the inoculation methods with wounds and without cotton pads were used. In the digestion of the ITS region, DNA bands ranging from 300 to 400 bp were obtained from the three isolates. The isolate F20C4 amplified a *V. dahliae* specific PCR band, but its RFLP profiles were different. Only the isolate F39C1 amplified the β -tubulin gene and produced RFLP bands ranging from 400 to 500 bp with *Alu* I, 300 to 400 bp with *Cfo* I and 500 to 600 bp with *Hinf* I were obtained. None isolate showed restriction patterns in the mtDNA digestion with *Hae* III. A multivariate analysis showed a cluster with the studied isolates, separated from the controls. The limitations of RFLP methods applied in this work to identify the pathogen *M. theobromae* are discussed.

Key words: *Musa* spp. *Musicillium*, *Musicillium theobromae*, isolates, RFLP, PCR.

1. INTRODUCCIÓN

La banana es la fruta fresca que más se consume en el país con un promedio de 12 kg/hab/año. El 80 % de la fruta se importa de Brasil, Ecuador y Bolivia en algunas ocasiones, y el 20 % es producido en las provincias de Formosa, Salta y Jujuy. Estas dos últimas provincias producen el 49.5 % del total en un área de 5000 ha aproximadamente, siendo un cultivo de importancia económica para la región. Sin embargo, las frutas pueden ser afectadas por una enfermedad cuarentenaria de tipo A2 (Resol. ex SAGyP 99/94), conocida como punta de cigarro, considerada en otros países tan importante como Sigatoka negra debido a las pérdidas de producción que ambas ocasionan (Matute Vargas y Guillen, 1992).

Herrera Dávila (2005) cita que punta de cigarro es de suma importancia en la parte oeste de África Central, donde Stover registró en 1972 una pérdida de 10000 racimos. La enfermedad fue citada por primera vez por Slabaugh en 1994 en Australia, luego en medio oriente, Egipto, Islas Canarias, Oeste de la India y en América del Sur (Jones, 2000) en Brasil (Cordeiro Maciel, 2000). Herrera Dávila (2005) mencionó que en plátanos la enfermedad causó entre 15 y 50 % de pérdidas de producción.

Entre las enfermedades que afectan al banano en Argentina, tales como sigatoka amarilla (causada por *Mycosphaerella musicola*), mancha de cordana (por *Cordana musae*), mancha por deightoniella (por *Deightoniella torulosa*), antracnosis (por *Colletotrichum musae*) (Tapia *et al.*, 2008) y podredumbre de la corona (Castelló *et al.*, 1986), también punta de cigarro ha sido mencionada (Carrera, 1972).

Punta de cigarro es causada por un complejo de hongos y se menciona como posibles agentes causales de la misma a *Verticillium theobromae* (Turconi) E.W. Mason & S. J. Hughes, *Fusarium* spp. y *Deightoniella torulosa* (Syd) Ellis (Góngora Benítez, 1999; Herrera Dávila, 2005; Lardizabal, 2007). En tanto que otros autores citan a *Musicillium theobromae* (Turconi) Zare & W. Gams (sinónimo *V. theobromae* Turconi E.W. Mason & S. J. Hughes – *Stachylidium theobromae* Turconi) (Carrera, 1972; Cordeiro Maciel, 2000; Ploetz, 2003; Zare *et al.*, 2007; Snowden, 2010) o a *Trachysphaera fructigena* Tabor and Bunting, este último oomicete no ha sido reportado en América del Sur (Ploetz, 2003; Baker *et al.*, 2008; Snowden, 2010). Meredith (1961) primeramente asoció a *V. theobromae* y *Deightoniella torulosa* (Syd) Ellis con la pudrición de la punta de la fruta; posteriormente Meredith (1965) postuló que *V. theobromae* con *Fusarium* spp. eran los responsables de la enfermedad.

En Argentina, *M. theobormae* fue citado por primera vez sobre raquis florales de la palmera *Euterpe edulis* del Parque Nacional Iguazú, provincia de Misiones (Capdet y

Romero, 2010), si bien, Carrera en 1972 citó a *Stachylidium theobromae*, hoy considerado sinónimo, causando la enfermedad en bananos en la localidad de Orán provincia de Salta.

Las condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad se encuentran en los ambientes de clima cálido con alta humedad relativa (Grajeda, 2001; Ploetz, 2003; Herrera Dávila, 2005; Mouliom Pefoura *et al.*, 2007). Se manifiesta tanto en el campo como en poscosecha con una podredumbre seca en el ápice de la fruta cubierta de las estructuras reproductivas de los hongos (signo de la enfermedad), dando el aspecto de un cigarro puro, de allí el nombre de la enfermedad punta de cigarro (Cordeiro Maciel, 2000; Perera Gonzáles y Molina León, 2002; Ploetz, 2003; Herrera Dávila, 2005; Snowden, 2010; Masudi y Bonjar, 2012). La diseminación se produce principalmente por agua de lluvia y viento (Perera Gonzáles y Molina León, 2002), infectando nuevas frutas. Provoca pérdidas considerables en el rendimiento y calidad, lo que desvaloriza las frutas en el mercado.

Como la enfermedad es relativamente nueva para nuestra región no hay registro cuantitativo de las pérdidas que causa, ni el conocimiento adecuado sobre su agente causal, motivo por el cual los productores no pueden implementar un plan de manejo para su control. Por todo lo expuesto generar conocimientos sobre la identidad de los agentes causales de la punta de cigarro es necesario y de importancia tanto a nivel regional como nacional.

1.1 Hipótesis

El hongo *Musicillium theobromae* es el agente causal de la enfermedad de la banana denominada punta de cigarro en las provincias de Salta y Jujuy.

1.2 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es determinar y caracterizar el/los agente/s causal/es que producen la enfermedad punta de cigarro en las provincias de Salta y Jujuy.

1.2.1 Objetivos particulares

Los objetivos particulares son:

- 1.- Determinar la prevalencia e incidencia de la punta de cigarro de la banana en las zonas bananeras de las provincias de Salta y Jujuy.
- 2.- Aislar, identificar y caracterizar morfológica, cultural y molecularmente las especies fúngicas patógenas asociadas a la punta de cigarro.
- 3.- Determinar la patogenicidad de los aislamientos fúngicos identificados.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origen y Taxonomía del banano (*Musa spp.*)

Las bananas que se conocen en la actualidad tuvieron su origen en el Sudeste de Asia y del Pacífico, todavía pueden encontrarse ejemplares ancestrales diploides en bosques de vegetación natural de esa región, no comestibles y con semillas (Robinson y Sauco, 2011). Varios autores coinciden en que el origen es el Sudeste Asiático, aunque también se mencionan lugares de desarrollo simultáneo como Malasia y las Islas Indonesias (Nelson *et al.*, 2006; Soto Ballester, 2008). A pesar de las investigaciones realizadas el origen exacto aún no es claro (Soto Ballester, 2008).

Son numerosas las culturas que se refieren a este fruto en sus escrituras antiguas. Se acepta que es una de las primeras frutas cultivadas por los agricultores originarios (May y Plaza, 1958) de pueblos de Oriente así como también en las culturas china, india, griega y romana (Soto Ballester, 2008).

A través del tiempo varias subespecies diploides de *Musa acuminata* Colla se cruzaron de forma espontánea dando lugar a la producción de numerosos híbridos interespecíficos, algunos de los cuales, con genoma triploide, eran partenocárpicos y con esterilidad femenina (Robinson y Sauco, 2011).

Los diploides y triploides seleccionados de *M. acuminata* fueron llevados por el hombre a las áreas monzónicas (India y Filipinas) donde crecían en forma silvestre junto a otra especie, *M. balbisiana*, diploide y seminífera. Se produjo así una hibridación interespecífica que dio lugar a cruces diploides y triploides de *M. acuminata* * *M. balbisiana* (Robinson y Sauco, 2011). De esta manera se originaron las especies comerciales que hoy en día se encuentran en los mercados del mundo.

Linneo realizó la primera clasificación científica de las bananas en 1783, dándole el nombre de *M. sapientium* a todas las bananas de postre caracterizadas por su sabor dulce en la madurez y consumidas en fresco. Le otorgó el nombre de *M. paradisiaca* al grupo de los plátanos con elevado contenido de almidón que son consumidos tras un proceso de cocción (Robinson y Sauco, 2011). Sin embargo, en la actualidad se conoce que esta clasificación no es la correcta para identificar las especies cultivadas. Se generó confusión en la taxonomía y sistemática del género *Musa* debido a la metodología inapropiada para la identificación de la diversidad genética del cultivo. A pesar de esto, numerosos autores coinciden en la participación de dos especies seminíferas silvestres, *M. acuminata* (genoma A) * *M. babisiana* (genoma B) de las cuales derivan las especies actuales comestibles.

Utilizando quince caracteres discriminantes, Simmonds y Shepherd (1955), mostraron que la contribución de las dos especies, *M. acuminata* * *M. babisiana*, a un cultivar dado podía ser claramente diferenciada. Entre los caracteres usados para la diferenciación se pueden mencionar el color del pseudotallo, el pedúnculo, los pedicelos, la forma y color de las brácteas, cicatrices, etc. Existen además otras clasificaciones para determinar el aporte genético de cada especie.

Como no existe un único nombre científico para el banano se utiliza el binomio y grupos para identificarlas. Algunos ejemplos de esta nomenclatura son:

- Grupo AAA: Subgrupo Gros Michel
Subgrupo Cavendish
- Grupo AAAA:
- Grupo AB:
- Grupo AAB:
- Grupo ABB
- Grupo BB
- Grupo BBB
- Subgrupo Plantain (plátanos)

2.2 Importancia mundial del cultivo

La banana es una de las frutas más consumidas en el mundo, y cultivada en la mayoría de los países tropicales (Borges y Souza, 2004) y subtropicales (Ministerio de la Agricultura, 2012) en más de 120 países (Caballero Hernández, 2011). Tiene una importancia fundamental para las economías de muchos países en desarrollo. En términos de valor bruto de producción, el banano es el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz (FAO, 2004), siendo la banana el principal producto del comercio internacional de fruta fresca (Cordeiro Maciel, 2000). Constituye una fuente importante de alimento, pudiendo ser utilizada verde o madura, fresca o procesada (cocida, frita, asada e industrializada). Posee vitaminas (A, B y C), minerales (Ca, K y Fe) y bajos niveles calóricos (90 a 120 kcal/100 g) y de grasa (0.37 a 0.48 g/100 g). Además contiene 70 % de agua y la materia sólida está formada principalmente por carbohidratos (23 a 32 g/100 g) y proteínas (1.0 a 1.3 g/100 g) (Borges y Souza, 2004). Es la fruta fresca de mayor consumo a nivel mundial, superada únicamente por los cítricos, seguida por la manzana y las hortalizas (Soto Ballester, 2008).

2.2.1 Los principales países productores a nivel mundial

El cultivo de banano cuenta con 4953315 ha cosechadas en todo el mundo y una producción de 101992743 t (FAOSTAT, 2012). El 56.1 % se localiza en Asia (especialmente India, China, Filipinas, Indonesia, Tailandia y Vietnam), el 26.2 % en América Latina y Caribe (Ecuador, Brasil, Guatemala, México, Costa Rica y Colombia) y el 15.8 % en África (FAO, 2014), habiéndose duplicado la superficie de producción entre la década de 1970 y la primera de este siglo (Molina *et al.*, 2015).

Los principales países productores de banano en el mundo para el periodo 2012/2014 expresado en millones de toneladas son, en primer lugar India (27042000 t), seguida de China (11816619 t), Filipinas (8935873.50 t), Brasil (6897403 t) y Ecuador (6503885.50 t) (Figura 1) (FAOSTAT, 2015).

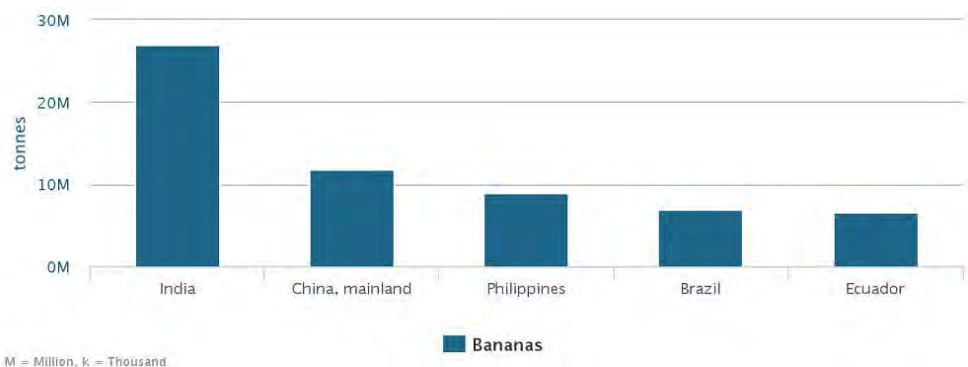


Figura 1: Estadística de producción mundial de bananas entre 2012/2014.

Fuente: FAOSTAT (2015). Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas. División de Estadística.

2.2.2 Principales países Exportadores e Importadores

La producción mundial es destinada principalmente a los mercados locales, cultivándose para la subsistencia o para el intercambio. (Soto Ballester, 2008; Robinson y Saucó, 2011). Solo se exporta el 1.62 % del total, las importaciones se concentran principalmente, en el mercado de Estados Unidos (Robinson y Saucó, 2011).

La banana ocupa el primer lugar entre las frutas frescas, tanto en volumen como en valor de las exportaciones mundiales (Molina *et al.*, 2015). Tomando como referencia el periodo 2000/2013 los principales países exportadores fueron: Ecuador (4780016.06 t), Costa Rica (2007646.38 t), Filipinas (1971956.56 t), Colombia (1596157.13 t) y Guatemala (1199527.19 t) (Figura 2) (FAOSTAT, 2016).

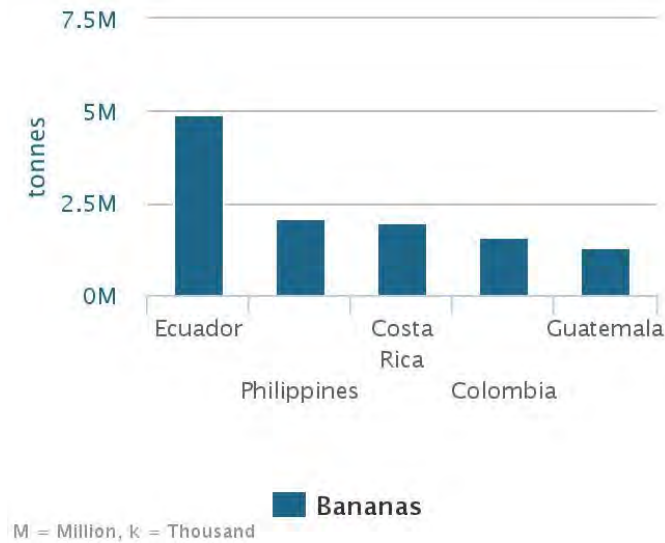


Figura 2: Principales países exportadores de banana en el periodo 2000/2013. Fuente: FAOSTAT (2016). Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas. División de Estadística.

En cuanto a los países que más importan esta fruta para el periodo 2000/2013 fueron (Figura 3): Unión Europea (EU) (4344462.64 t), Estados Unidos (3992329.50 t), Alemania (1245117.29 t), Bélgica (1162800 t) y Japón (1048527.93 t) (FAOSTAT, 2016).

Argentina no participa en las exportaciones mientras que si lo hace en las importaciones con un promedio de 394881 t ocupando el puesto 19 a nivel mundial (FAOSTAT, 2011).

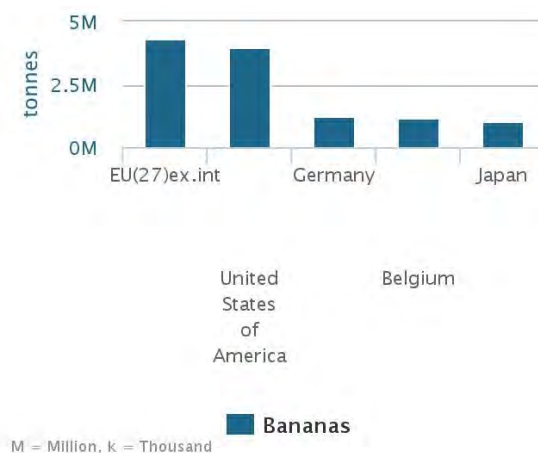


Figura 3: Principales países importadores de banana en el periodo 2000/2013. Fuente: FAOSTAT (2016). Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas. División de Estadística.

2.2.3 Importancia nacional

La introducción del bananero en Argentina con fines de cultivo, parece haberse realizado en 1915/1916, época en que los hermanos Leach hicieron las primeras plantaciones racionales en Calilegua (Jujuy). Sin embargo se supone que irregularmente ya el bananero había sido introducido en el litoral formoseño, en Misiones y en algunos puntos de Corrientes, donde se realizaban cultivos familiares sin importancia. Posteriormente para la década de 1950 el cultivo se produjo comercialmente en las provincias de Formosa, Salta, Jujuy, Misiones, Corrientes, Chaco y Tucumán (Berardi, 1960). La producción comercial del banano en nuestro país (Figura 4) actualmente se concentra en dos regiones subtropicales: la región Noreste Argentino (NEA, provincia de Formosa) y región Noroeste Argentino (NOA, provincias de Salta y Jujuy):

- En la provincia de Formosa, alcanzó las 7500 ha en la década del setenta, posteriormente fue retrocediendo hasta llegar a 1500 ha en la actualidad. La principal zona productora de la provincia se encuentra ubicada en el departamento de Pilcomayo, en la localidad de Laguna Nainck y alrededores, abarcando parte del departamento de Pilagás (Mazacotte *et al.*, 2011).
- En el NOA, la región de Salta-Jujuy se concentró en el departamento de Orán (Salta) en las localidades de Orán y Colonia Santa Rosa; en el departamento de Ledesma (Jujuy) en las localidades de Fraile Pintado y Yuto-Bananal (Arroyo y Rodríguez, 2005; Tapia y Fagiani, 2009). La superficie de producción es muy oscilante pasando de 5470 ha en 1999 a 4100 ha en 2005 (Arroyo y Rodríguez, 2005), y según Colamarino (2010) alcanzó las 5000 ha. Esta superficie ha disminuido considerablemente hasta las 2500 ha entre ambas provincias (datos consultados a productores en 2015).

En el año 2011, la producción nacional tuvo una participación relativa en el Mercado Central de Buenos Aires (MCBA) con un 15 % aproximadamente del total de la comercialización (Gacetilla de Frutas y Hortalizas del convenio INTA-CMCBA, 2012).

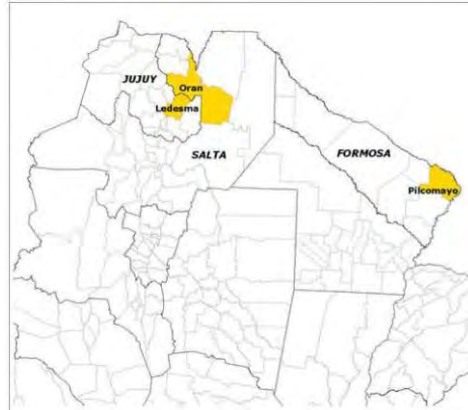


Figura 4: Zonas de la producción de Banana en Argentina. Fuente Heit, 2009.

2.3 Descripción botánica (Gran parte de la información está recopilada del libro de Soto Ballester, 2008 – Bananos técnicas de producción, manejo poscosecha y comercialización)

2.3.1 Aspectos generales

Los bananos son plantas herbáceas, monocotiledóneas, perennes y siempre verdes (Robinson y Saucó, 2011), con pseudotallos aéreos que se originan en cormos carnosos, en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales (llamados comúnmente hijos, hijuelos o retoño en el campo). Las hojas tienen una distribución helicoidal (filotaxia espiral) y las bases foliares circundan el tallo (o corno) dando origen al pseudotallo. La inflorescencia es terminal y crece a través del centro del pseudotallo hasta alcanzar la superficie (Soto Ballester, 2008). En la figura 5 se muestran los diferentes órganos de una planta de banano.

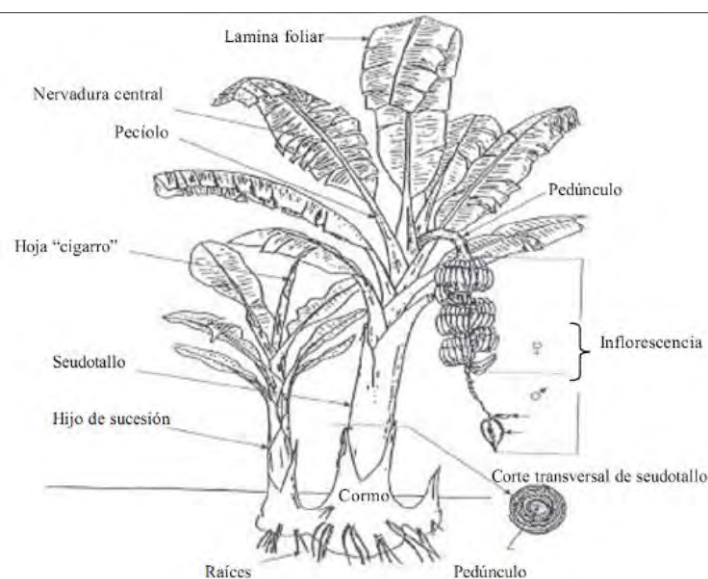


Figura 5: Planta madre de banano con yema lateral (retoño o hijo de sucesión) e inflorescencia (Champion, 1963 - Tomado de Caballero Hernández, 2011).

2.3.2 Morfología de las estructuras vegetativas

2.3.2.1 Sistema radical

En las plantas de banano propagadas vegetativamente el sistema radical es carnoso y adventicio desde su inicio (transplante en el campo). Las raíces primarias (o adventicias) emergen de la superficie externa del cilindro central del cormo, normalmente en grupo de dos o cuatro (Soto Ballester, 2008; Robinson y Saucó, 2011). De cada raíz primaria se desarrolla un sistema radical secundario y terciario, cuyas raíces van progresivamente adelgazándose y acortándose en relación a la raíz primaria. A una distancia determinada de los ápices radicales de las raíces primarias y laterales emergen las raíces de cabellera, que son responsables de la mayor parte de la absorción de agua y nutrientes efectuada por la planta. El sistema radical adventicio del banano tiene una gran longitud, pudiendo las raíces primarias extenderse horizontalmente hasta una distancia de cinco metros (Robinson y Saucó, 2011) aunque normalmente solo exploran uno o dos metros (Soto Ballester, 2008; Robinson y Saucó, 2011). El tipo de suelo, la compactación y el drenaje influyen notablemente en la distribución radical tanto lateralmente como en profundidad (Roque Vaquero, 2005). Bajo condiciones armónicas entre el sistema radical y el foliar la planta producirá frutos económicamente rentables y de buena calidad (Soto Ballester, 1994 – Tomado de Román, 2012).

Las raíces son de crecimiento rápido y muy sensibles al déficit o exceso hídrico, ya que el 65 % de ellas se encuentra en los primeros 30 cm del suelo (crecimiento superficial). El exceso de agua puede producir asfixia radical, es por ello que en la estación lluviosa el crecimiento de raíces es deficiente, con pérdidas muy sensibles en la producción (Lara, 1970). Cuando una raíz encuentra un obstáculo que impide su crecimiento en longitud, cambia de trayectoria y desarrolla raíces laterales menores en número de dos, tres o más en el sitio de desviación. Algunas pueden alargarse y alcanzar el diámetro de aquella que les dio origen (Mallessard, 1966). La aparición de las raíces laterales es lenta (8 a 10 días) y parece no tener dirección (Lassoudière, 1971). Las raíces laterales aparecen de 15 a 30 cm antes del ápice de la raíz en que se originan (Mallessard, 1966; Lassoudière, 1971).

2.3.2.2 Cormo

El verdadero tallo de la planta de banana es parcial o totalmente subterráneo, y es conocido técnicamente como un rizoma tuberoso (Robinson y Saucó, 2011) o cormo según Soto Ballester, (2008) quien lo define como un tallo que desarrolla hojas en la

parte superior y raíces adventicias en la parte inferior o rizomorfo. Si un cormo se corta longitudinalmente, el meristema apical se observa en una depresión encerrada entre las bases foliares circundantes. El cormo es un importante órgano de almacenamiento que permite el crecimiento del racimo y del retoño en su desarrollo (Robinson y Sauco, 2011). El cormo posee entrenudos muy cortos y crece poco en altura; sin embargo, es grueso y carnoso debido a la gran cantidad de parénquima. Los nudos están muy agrupados y en cada uno de ellos hay una hoja cuya base foliar se extiende lateralmente hasta circundar el cormo (Charpentier, 1966; Champion, 1968). Las yemas laterales de *Musa* no se localizan en la posición clásica de las yemas laterales de otras plantas, sino a 156° de la posición original (Soto Ballester, 2008), pero sólo entre las yemas tres y cinco se desarrollan retoños (Robinson y Sauco, 2011).

Conforme la planta se acerca a la etapa de floración la parte central del cormo se comienza a esclerotizar desde la base hacia el ápice. Este fenómeno inactiva las raíces basales, y limita la emisión de nuevas yemas y raíces en esas partes (Soto Ballester, 2008).

2.3.2.3 Yemas laterales (brotes, hijos o retoños)

Los brotes o retoños, mejor conocidos en los medios bananeros como “hijos”, se desarrollan a partir de las yemas laterales del cormo (Soto Ballester, 2008). Existen dos tipos de retoños, llamados hijos de espada, tienen hojas estrechas con un cormo de base gruesa manteniendo una conexión fuerte con la planta madre (seleccionados para el siguiente ciclo). Los hijos de agua tienen hojas anchas y un cormo de base estrecho conectándose débilmente con la planta madre (los cuales se eliminan en el momento del deshijado) (Robinson y Sauco, 2011). Tanto los hijos espada o agua emergen siguiendo un patrón filotáxico común de $2/5$ (156°). Por esta razón, De Langhe (1961), propuso un esquema en forma de pentágono para explicar la aparición de retoños sobre el cormo (Figura 6). Al primer hijo se le llama “hijo axial” o puntal (Soto Ballester, 2008). Este hijo axial es elegido preferentemente (en la mayoría de los casos) para continuar el siguiente ciclo y también asegurar la alineación en línea recta de la plantación, manteniendo así la organización espacial inicial (Robinson y Sauco, 2011). Los pentágonos se yuxtaponen uno sobre otro y entre la posición uno del primer pentágono y la seis del segundo hay una variación de 20° , manteniéndose en los pentágonos sucesivos (Soto Ballester, 2008; Robinson y Sauco, 2011).

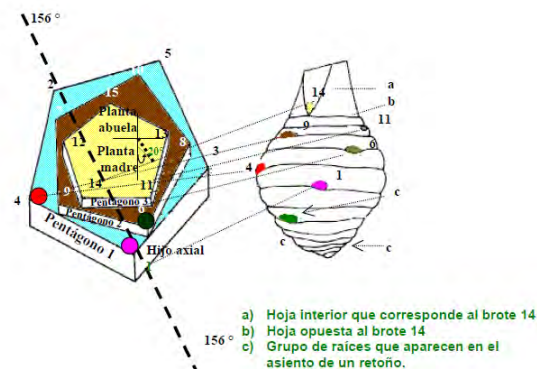


Figura 6: Orden de aparición de los brotes en un cormo de banano. Los números del 1 al 6 representan el conjunto de brotes susceptibles de producir retoños. Los brotes aparecen en pentágonos sucesivos separados en 20° .

Fuente: Aubert, B. Fruits, (1973) modificado de De Langhe (1961). Figura tomada de Soto Ballester (2008).

El desarrollo de nuevos retoños (yemas laterales) está influenciado por la dominancia apical de la planta madre y por los hijos ya desarrollados. Un nuevo retoño idealmente alcanza 50 cm a los tres meses de edad, con una actividad vegetativa moderada, es decir, que todavía recibe nutrientes de la planta madre (Soto Ballester, 2008). La independencia del hijo aparentemente ocurre después de desarrollar de 7.5 a 12.5 hojas muy reducidas, da origen a una nueva hoja con una lámina foliar cuyo ancho es cercano a los 10 cm; Lassoudière (1978c, 1979b) denomina dicha hoja como "F10". Esta se usa como índice para medir el crecimiento de la planta. Después de la emergencia de esa hoja, aparecen otras, el número es variable y va de acuerdo con el estado de desarrollo de la planta. En un momento determinado aparece la primera hoja normal según las características del clon. Esta tiene las dimensiones mínimas de la relación foliar del clon correspondiente y se denomina "Fm". Su emisión se produce entre la hoja número 13 y la 20, y tiene lugar en un determinado estado de desarrollo de la planta y no de acuerdo a su crecimiento. La aparición de la hoja "Fm" se considera como el inicio de la fase autónoma del hijo, y puede situarse desde 10 hasta 50 días antes de la cosecha de la planta madre (Lassoudière, 1979a, 1980a, 1980b). Tabares y Falques (1997), encontraron que la etapa entre el inicio del crecimiento de la yema hasta F10 tiene una duración promedio de 104 días, con una producción de 12 hojas; la duración de la etapa de F10 hasta Fm es de 91 días promedio, con 11 hojas; y la etapa Fm a F (emisión de la flor) es de 125 días promedio, con una producción también de 11 hojas, para un total de hojas emitidas de 30 ± 3 (Figura 7). La etapa de F a C (cosecha del fruto) es de 84 días en promedio, con lo que la duración total del ciclo biológico fue de 404 días promedio. El hijo de sucesión (retorno), se

empezó a desarrollar a los 168 días del inicio de la planta madre. La duración de las etapas no sólo varía dentro de cada ciclo biológico, sino también con las condiciones ecológicas, la latitud, la altitud, entre otras.

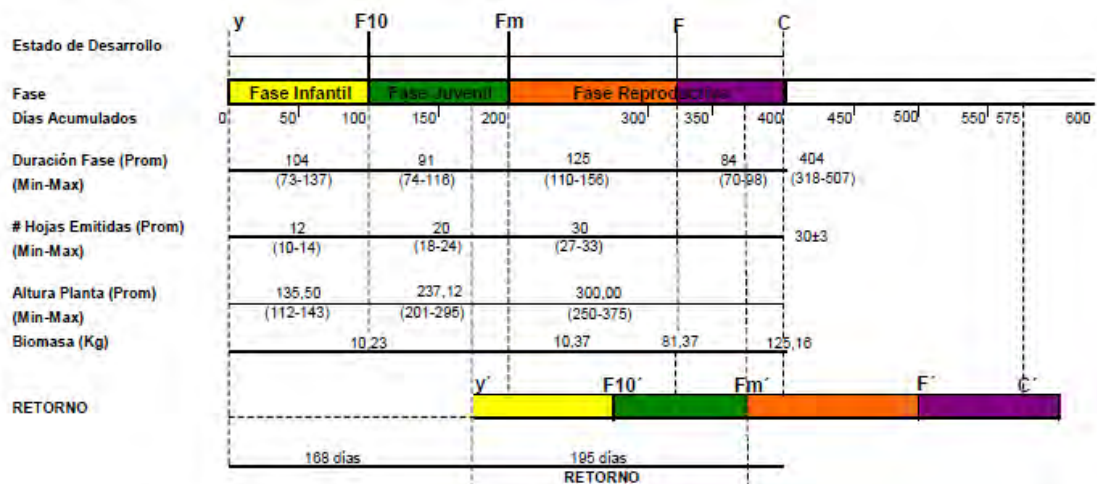


Figura 7: Representación esquemática de desarrollo fenológico por fases de una planta de banano y su retoño (Soto Ballester, 2008).

Referencias: Y: yema, desarrollo del sistema lateral; F10: primera hoja con 10 cm de ancho; Fm: primera hoja con relación foliar mínima; F: emisión de la flor; y C: cosecha del fruto.

Para obtener una fruta grande, el intervalo entre la aparición de la hoja “F10” y la hoja “Fm” debe ser largo; en él deben emitirse de 8 a 9 hojas. Si es corto (4 a 5 hojas) el racimo será pequeño, porque la planta no tendrá suficientes reservas nutricionales para una buena diferenciación floral y desarrollo del fruto al independizarse de la planta madre. El intervalo comprendido entre el desarrollo de la yema lateral o hijo y la aparición de la hoja “Fm”, es un periodo en el cual el retoño depende básicamente de la planta madre, debido a la estrecha relación que existe entre ambos (Lassoudière, 1980b). Sin embargo, como la emisión de raíces de la planta madre se detiene antes de la floración, esto está dado entre la emisión de la hoja Fm y la independencia del mismo, cesa la dominancia apical por parte de la madre, momento en que el retoño tiene un desarrollo apropiado como una altura adecuada del tallo y suficiente sistema foliar y radical (Soto Ballester, 2008). Lassoudière (1979a), afirma que el crecimiento del hijo durante el mes siguiente a la floración de la planta madre, es primordial para el desarrollo del mismo. Una vez que el retoño se independiza prosigue su desarrollo hasta florecer y producir frutos. De acuerdo con la bibliografía consultada se puede sintetizar el desarrollo del retoño en tres fases:

- Fase infantil: Comprende el periodo desde la aparición de la yema lateral hasta la independencia de la planta madre.

- Fase juvenil: Es el intervalo entre la independencia del hijo de la planta madre, la emisión de la primera hoja normal (Fm) y la diferenciación floral (DF).
- Fase reproductiva: Es el lapso comprendido entre el inicio de la diferenciación floral y la cosecha del fruto.

La diferenciación floral se da en el momento cuando la planta ha producido 15 hojas, y está cerca de Fm. En dicho momento la planta ha emitido todas las hojas, pero sólo han emergido la mitad.

2.3.2.4 Sistema foliar

Las primeras hojas tienen forma de escamas y a éstas le siguen otras estrechas y de forma lanceolada (Robinson y Sauco, 2011), y constan de base o vaina foliar, pseudopetiolos y láminas (Soto Ballester, 2008). Una planta de banano emite generalmente entre 25 y 50 hojas (Robinson y Sauco, 2011), con una frecuencia de emisión de una hoja por cada 7 a 10 días en condiciones favorables (Aubert, 1973), en general una hoja por semana es un buen índice de producción (Simmonds, 1973; Lassoudière, 1978c). Se constató que el número de hojas emitidas y el tiempo de emisión, son características fijas y que el mantenimiento de ocho hojas es suficiente para obtener un desarrollo normal del racimo hasta la cosecha (Lassoudière, 1978c, 1978d y 1978e). Las hojas están distribuidas en forma espiral, el patrón filotáxico varía en los diferentes clones y especies. Las largas bases foliares se superponen y forman un pseudotallo robusto, a través del cual crece la inflorescencia terminal (Soto Ballester, 2008; Robinson y Sauco, 2011). El pseudotallo ofrece a la planta apoyo y la capacidad de almacenar reservas amiláceas e hídricas, como también, elevar el nivel de las láminas foliares que captan la luz solar. En una planta adulta el pseudotallo puede medir 5 m de altura y 40 cm de diámetro según el clon. Su estructura es resistente y puede soportar el peso de las láminas foliares y de su inflorescencia (Aubert, 1973; Simmonds, 1973).

2.3.2.5 Inflorescencia

En una de las fases intermedias del desarrollo fisiológico de la planta de banano, una parte del punto de crecimiento se transforma en una yema floral, para iniciar la inflorescencia (Robinson y Sauco, 2011). Días después en una etapa de diferenciación avanzada se observa un tallo o raquis muy pequeño que la une con el cormo. Cuando la inflorescencia sale por el centro del pseudotallo, puede tener de 5 a 8 cm de diámetro y es de color blanco. Cuando emerge del mismo y se convierte en raquis externo o pinzote se torna de color verde (Simmonds, 1973). La inflorescencia por lo

tanto, es una espiga compleja consistente en un pedúnculo corpulento en el cual se disponen las flores en racimo (Robinson y Sauco, 2011). Cuando el tallo floral está totalmente formado se pueden distinguir varias zonas con características externas diferentes, que son:

- Una zona comprendida entre el cormo en su parte más ancha y la base de la primera bráctea vacía, es decir, sin glomérulos florales.
- Una parte que se extiende desde la primera bráctea vacía a la primera bráctea con glomérulo de flores femeninas o pistiladas.
- Una zona que empieza en la bráctea de la primera mano de flores pistiladas y termina en el ápice de la chira floral. Esta última parte corresponde al tamaño de la inflorescencia que formará el racimo (Lassoudière, 1978d).

Las tres zonas descritas son lo que en conjunto se considera como la longitud total de la inflorescencia (Figura 8).

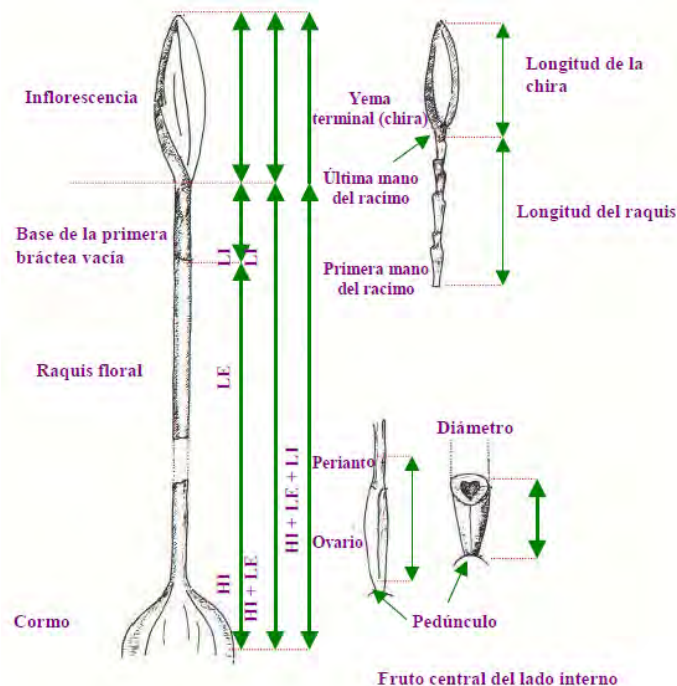


Figura 8: Medidas sobre la inflorescencia en el interior del pseudotallo (después de la disección). HI: altura de la inflorescencia; LE: longitud de los entrenudos de las brácteas vacías; LI: longitud de la inflorescencia. Fuente: Lassoudière, 1978e en *Fruits* 33(7-8):492-503.

Desde la iniciación floral hasta la salida de la inflorescencia, la yema dura aproximadamente 20 días y el raquis floral crece en longitud 6.5 cm por día. La velocidad de crecimiento de la parte masculina o estaminada del raquis decrece, pero continúa constante después de 30 días en su salida del pseudotallo (Soto Ballester, 2008). El raquis alcanza su tamaño definitivo 50 días después de la iniciación floral, es

decir, un mes después de la floración (Lassoudière, 1978d). Cuando se inicia la floración, el ápice se alarga y origina las brácteas de la inflorescencia, que aparecen en forma de espiral y no rodean completamente al pedúnculo (Robinson y Sauco, 2011). De cada bráctea se origina el glómérulo floral dispuesto en dos hileras, superior e inferior, que darán lugar al peine o mano de frutas (Soto Ballester, 2008). Los glómérulos basales (proximales) portan de 5 a 18 flores femeninas y los glómérulos distales portan flores masculinas que permanecen encerradas por las brácteas. Las últimas brácteas del raquis floral tienen el aspecto de un corazón denominado pinzote o bellota (Robinson y Sauco, 2011). El desarrollo de la inflorescencia dentro del pseudotallo tiene una duración de más de 100 días; y entre la diferenciación floral (DF) y la floración (F) pueden transcurrir de 45 a 90 días (Soto Ballester, 2008).

2.3.2.6 Desarrollo de las flores

Los órganos florales se desarrollan en la siguiente secuencia: perianto, estambres y carpelos. No hay diferencia obvia en el origen de las flores estaminadas funcionales y las flores pistiladas (Ram *et al.*, 1962). Las flores son zigomórficas (que tiene un solo plano de simetría, es decir un lado es siempre diferente al otro). Las flores estaminadas tienen gineceos rudimentarios con el interior lleno de invaginaciones de la pared ovárica. En las flores pistiladas funcionales no se forman estambres con anteras y filamento, sino que éstos permanecen sin desarrollar. Por el contrario en las flores estaminadas hay un desarrollo anormal de filamentos y anteras. En las flores pistiladas el ovario se desarrolla en forma partenocárpica. Las flores estaminadas son más pequeñas y usualmente sufren abscisión del perianto, del estilo y de los estaminoideos. Ello constituye una característica de diferenciación entre clones. El racimo es cosechado de 80 a 120 días después de la salida de la inflorescencia (Soto, 2008) cuando los frutos alcanzan un grado determinado que corresponde a un estado cercano a la maduración (Champion, 1968; Simmonds, 1973; Lassoudière, 1978d). La longitud de la inflorescencia pasa de 56.60 cm (a los cuatro días de emergencia) a 68.30 cm a la edad de 83 días (Figura 9) (Soto Ballester, 2008), características que pueden variar según el clon comercial, zona de producción y estado del cultivo.

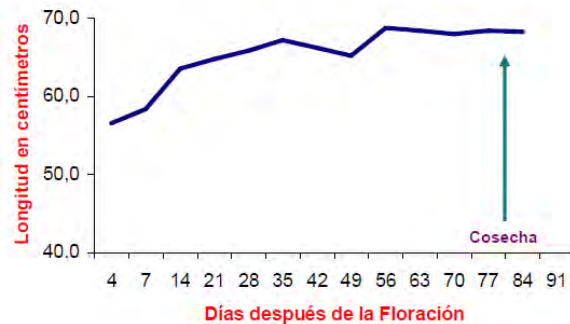


Figura 9: Crecimiento de la inflorescencia desde 4 días después de la floración hasta la cosecha. Fuente: Soto Ballesteró (2008).

2.3.2.7 Desarrollo del fruto

El fruto es una baya, que se origina en un ovario ínfero en forma partenocárpica desarrollando una gran cantidad de pulpa sin que exista polinización (Robinson y Sauco, 2011). Al inicio, el ovario crece en longitud y en diámetro. Luego el tejido del pericarpio (pared ovárica) que está sobre los lóculos se invagina sobre los mismos, el eje floral, la placenta y los septos se dividen mitóticamente y se expanden (Soto Ballesteró, 2008). El desarrollo del fruto tiene dos fases, la que ocurre antes de la emisión de la inflorescencia que está dominada por el crecimiento de la piel y la que ocurre después de la emisión donde la pulpa no comienza a desarrollarse hasta que el fruto se reorienta hacia arriba (Robinson y Sauco, 2011), después de dos a tres semanas, momento cuando se recomienda desflorar para evitar la enfermedad punta de cigarro (Soto Ballesteró, 2008). Otros autores como Ram *et al.* (1962), fijan tres fases en el desarrollo del fruto:

- Hasta 4 semanas después de la emergencia fin de la división celular,
- De 4 a 12 semanas: crecimiento celular.
- De 12 a 15 semanas: maduración.

La longitud final de los dedos se alcanza en un periodo de 30 a 35 días después de la floración, y las condiciones ecológicas adversas que puedan detenerla son irreversibles, ya que no pueden ser compensadas con condiciones óptimas desde ese momento hasta la cosecha. Si se toma el peso de los dedos, como índice de crecimiento en longitud y diámetro, se encuentra que existen tres fases:

1. Crecimiento rápido hasta los 28 días después de la floración con un aumento de peso promedio de 1.54 g por día.
2. Estacionamiento de crecimiento entre los 28 y los 38 días, con un aumento de peso promedio de 0.2 g por día.

3. Fase exponencial, donde la velocidad de crecimiento alcanza un promedio de 2.02 g por día.

La primera fase corresponde al periodo de elongación del dedo, por división celular. La segunda es un periodo de transición entre la división celular y el crecimiento celular de la tercera fase que se opera en el fruto con almacenamiento de almidones. Durante este proceso el fruto pasa de forma angulosa hasta ser cilíndrico (Figura 10: a y b) (Soto Ballestero, 2008).

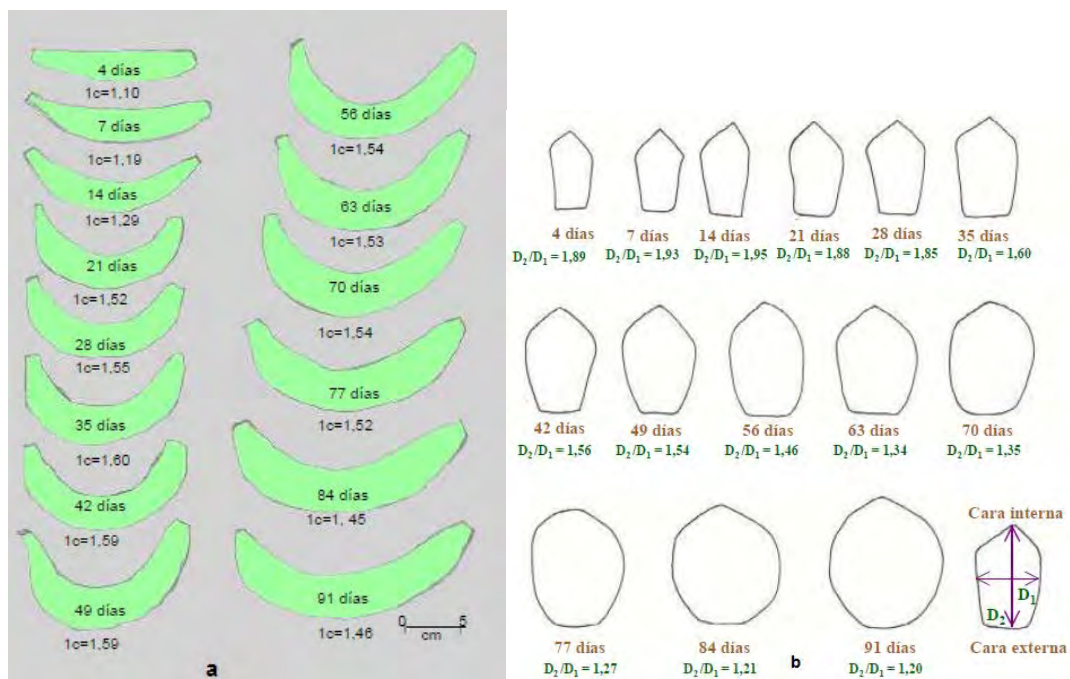


Figura 10: a) Evolución del tamaño y forma del dedo central de la segunda mano desde cuatro días después de la floración. b) Evolución de la superficie transversal del fruto central de la segunda mano desde la floración hasta la cosecha. Fuente: Soto Ballestero (2008).

El engrosamiento de los dedos en diámetro se mide como grado y el fruto o dedo tiene dos diámetros (D_1 y D_2). Donde D_1 es el diámetro medido en el sentido de la hilera, y D_2 es el diámetro medido entre la cara externa y la cara interna del fruto. Siendo que D_1 crece mucho más que D_2 , por lo tanto se deduce que en la última semana antes de la cosecha, el crecimiento en D_2 es acelerado hasta los 42 días, luego continúa aumentando siempre, pero a un ritmo menor. El diámetro de los dedos en frutas a cosechar se denomina con el término grado, que es el diámetro D_1 que equivale a 0.8 mm (Soto Ballestero, 2008). Lassoudière (1978d), afirma que el aumento de grado es casi constante hasta la séptima semana, pero que a los 56 días se observa una ligera modificación en la curva de elongación que significa una aceleración en la cercanía de la cosecha.

2.4 Manejo Agronómico

Las condiciones óptimas para el cultivo de banano se dan en las regiones tropicales húmedas y cálidas, donde las plantas presentan un crecimiento continuo. La luz, la temperatura y la reserva de agua son determinantes, así como un buen contenido de nutrientes (Simmonds, 1962; Stover y Simmonds, 1987; Soto Ballester, 1990; León, 2000; Ortiz *et al.*, 2001). La temperatura óptima para el crecimiento del cultivo es de 26 °C, factor que influye en el ciclo vegetativo, el requerimiento hídrico promedio es de 1800 mm anuales (Palencia *et al.*, 2006) y suelos de texturas variadas como franco arenosa, franco arcillosa, franco arcillo limosa o franco limosa, que tengan buen drenaje interno, alta fertilidad y una profundidad de 1.2 a 1.5 m (Borges y Souza, 2004; SINAVIMO – SENASA, 2009).

Con estas condiciones el cultivo de banano necesita algunas prácticas agrícolas indispensables para la obtención de una producción sustentable. Estas prácticas son:

Desmalezado: en los primeros seis meses se debe mantener limpio de malezas, evitando la competencia con el cultivo (Palencia *et al.*, 2006; Moreno Mena *et al.*, 2009; Ríos y Montoya Pérez, 2012).

Deshije: es la eliminación de los retoños en un estado no muy avanzado, dejando aquel que será apto para el próximo ciclo de producción (Palencia *et al.*, 2006; Ríos y Montoya Pérez, 2012).

Deshoje: consiste eliminar las hojas amarillas, dobladas, secas y bajas para favorecer la libre circulación del viento, al igual que la penetración de los rayos solares que favorecen el crecimiento y desarrollo de las futuras generaciones (Palencia *et al.*, 2006; Ríos y Montoya Pérez, 2012).

Desbellotado (=descorazonado o eliminación del pinzote): práctica que proviene de la eliminación de la bellota de la inflorescencia (Palencia *et al.*, 2006; Ríos y Montoya Pérez, 2012), para evitar el ataque de enfermedades y plagas que son atraídas por el néctar de las flores (Palencia *et al.*, 2006). Se corta cuando se ha determinado la cantidad total de manos en la inflorescencia favoreciendo el llenado del fruto.

El apuntalamiento y el embolsado de los racimos son prácticas que no todos los productores las realizan. El apuntalamiento consiste en tutorar las plantas que tengan racimos muy grandes evitando el vuelco de la planta por el peso del racimo por vientos fuertes. El embolsado de los racimos sirve para proteger las frutas de daños por insectos (raspadores o chupadores), quemado de la cáscara por el sol y también favorece el llenado de los frutos de buena calidad (Palencia *et al.*, 2006).

Desflore en el campo: es la eliminación de residuos florales en fruta joven, práctica que sirve para eliminar o reducir la pudrición de punta del fruto causada por los hongos *V. theobromae*, *Fusarium* spp. y *D. torulosa* (Góngora Benítez, 1999; Herrera Dávila, 2005; Lardizabal, 2007). Según Soto Ballestero (2008), si la operación se realiza 20 a 30 días después de la floración, resulta inútil para el propósito buscado, pero si se quitan inmediatamente después de su formación se reduce la infección. Esta enfermedad afecta al fruto y se la encuentra tanto en frutas inmaduras en el campo (Soto Ballestero, 2008) como en poscosecha (Mendoza Padilla y Beltré Mercedes, 2000).

2.5 La enfermedad punta de cigarro

2.5.1 Síntomas

Los síntomas de punta de cigarro comienzan con una necrosis que se distribuye desde el perianto hacia la punta de los frutos inmaduros, la pulpa en la parte interna desarrolla una pudrición seca. El tejido necrótico se corruga y se cubre de micelio y esporas del agente causal (signo), que le otorgan el aspecto de una ceniza grisácea como si fuera la de un cigarro. El tejido enfermo está delimitado por el tejido sano mostrando una banda negra y algunas líneas con clorosis. El tejido se pudre lentamente, puede afectar más de dos centímetros de profundidad (Cordeiro Maciel, 2000; Perera González y Molina León, 2002; Ploetz, 2003; Herrera Dávila, 2005; Snowden, 2010; Masudi y Bonjar, 2012), y en casos muy severos llega a momificar los frutos.

2.5.2 Agentes causales

2.5.2.1 *Musicillium theobromae* (Turconi) Zare & W. Gams (sinónimo *V. theobromae* Turconi E.W. Mason & S. J. Hughes – *Stachylidium theobromae* Turconi)

La mayoría de los autores hacían referencia que *V. theobromae* era el agente causal de punta cigarro, hasta que Zare *et al.* (2007), a través de un estudio molecular renombró a *V. theobromae* como *Musicillium theobromae*. Dicho autor encontró diferencias muy puntuales de estructuras morfológicas y moleculares de este último que no son propias del género *Verticillium*, resultando taxonómicamente de la siguiente manera:

Antiguamente

Reino: Fungi
 Filo: Ascomycota
 Clase: Sordariomycetidae
 Subclase: Hypocreomycetidae
 Orden: Hypocreales
 Familia: *Sedis incertae*
 Género: *Verticillium*
 Especie: *V. theobromae*

Actualmente

Reino: Fungi
 Division: Ascomycota
 Clase: Sordariomycetes

 Orden: *Sedis incertae*
 Familia: Plectosphaerellaceae
 Género: *Musicillium*
 Especie: *M. theobromae*

Nombre binomial: *Verticillium theobromae* (Turconi) Mason & Hughes, 1951.

Musicillium theobromae (Turconi) Zare y W. Gams 2007.

Sinonimos: *Stachylidium theobromae* Turconi 1920.

Si bien morfológicamente *M. theobromae* es similar a *V. albo-atrum* (Hawksworth y Holliday, 1970), las características distintivas de la especie nueva son: conidióforos largos, de color marrón, paredes gruesas con pronunciados verticilos de fiálides (Zare *et al.*, 2007), mientras que los conidióforos de *V. theobromae* son erectos, hialinos a amarronados, de 4-6 x 150 a 400 µm, solitarios o en pequeños grupos en la superficie del tejido afectado (Ploetz, 2003; Herrera Dávila, 2005). Los conidios elipsoidales a sub-cilíndricos de 3-8 x 1.5-3 µm nacen en el extremo de un conidióforo y están agregados formando falsas cabezas mucilaginosas y translúcidas (Ploetz, 2003).

Las colonias de *M. theobromae* crecen 40 a 50 mm de diámetro en 10 días a 20 °C en medio de cultivo OA (Agar Avena) y cerca del centro se tornan de color gris marrón, hifas marrón pálido, 2-3.5 µm de ancho, inicialmente no torulosa, pero después de dos semanas las hifas se vuelven torulosas, inicialmente subhialina, luego marrón, 8-10 µm, y a veces la agregación es similar a la estructura de los microesclerocios. Los conidióforos claramente distintos de las hifas vegetativas, por su pigmentación marrón que se extiende hacia la parte superior, en algunos casos a 250 µm, en otros a 500 µm de altura, en la base 2.0-2.5 (-3.5) µm de ancho, a veces indistintamente con superficies rugosas, presentan hasta 6 verticilos de 3-6 fiálides en la parte superior (Zare *et al.*, 2007; Masudi y Bonjar, 2012). Estas fiálides son subhialinas, con extremos agudos, 17-35 µm de largo, se estrechan desde 1.5-2.7 µm cerca de la base a aproximadamente 1(-1.5) µm en la punta y muestran bordes engrosados de la pared periclinal apenas reconocibles. Los conidios adheridos en cabezas viscosas son hialinos, de paredes lisas, cilíndricos con extremos redondeados simétricamente, miden 4-6.5(-9)x1.0-1.7(-2.0) µm, L/W=(2.5-)-3-4.5(-5.4). La colonia tiene olor indefinido

(Zare *et al.*, 2007) (Figura 11). Además *M. theobromae* tiene cierta similitud con *Stachylidium bicolor* Link: Fr., porque los conidióforos se pigmentan de manera similar, pero en ese género las fiáldes son relativamente cortas y estrechas en la punta. *S. theobromae* originalmente fue encontrada en hojas decoloradas de *Theobroma cacao* en el Jardín Botánico en Pavia, creciendo junto con *Physalospora theobromae* Turconi. *Musicillium* fue introducido aquí como el agente causal de punta de cigarro. El primer componente del nombre genérico elegido destaca la asociación con la planta huésped (*Musa*), mientras que el segundo componente refleja la similitud del organismo a *Verticillium* (Zare *et al.*, 2007).

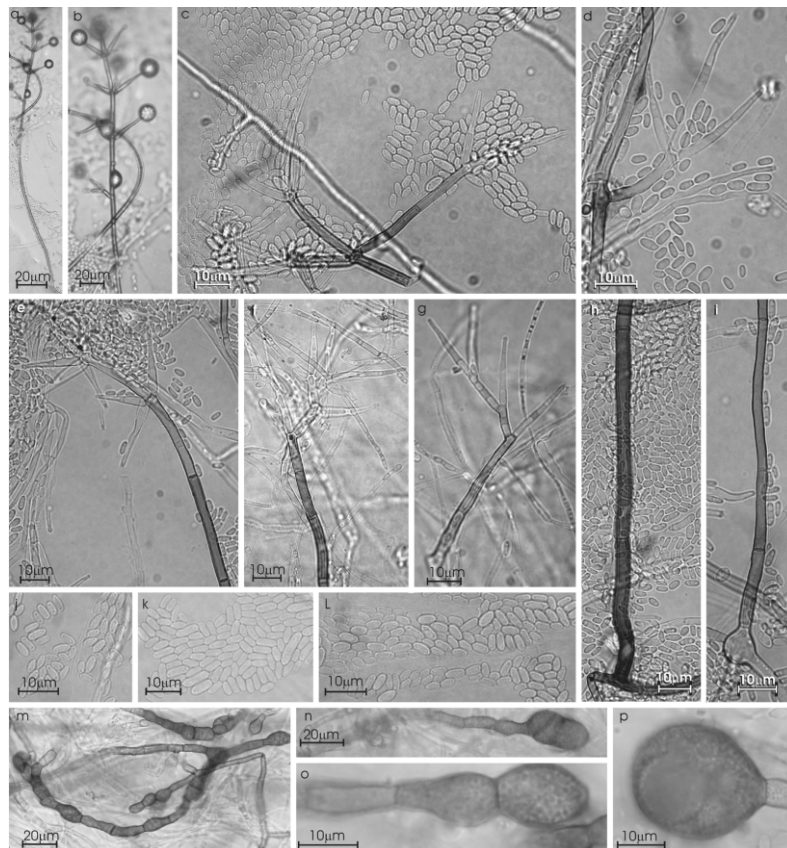


Figura 11: Microfotografías de *Muscillium theobromae*. a-e, h, i, k-p. IRAN 930C, f, g, j. IRAN 452C. Imagen tomada de Zare *et al.* (2007).

2.5.2.2 *Fusarium* spp.

En distintos países diferentes especies de *Fusarium* también han sido aisladas a partir de la pudrición de la punta de cigarro. Este género sobrevive en el suelo o en rastrojos de cultivos, como clamidosporas, en alguna de las especies y pueden sobrevivir en estos casos varios años. Los propágulos del hongo son diseminados a través del movimiento del suelo o rastrojos contaminados, por el agua, viento o las personas

(Booth, 1971; Leslie y Summerel, 2006). Las especies que se asocian a esta y otras enfermedades del fruto de la banana son *F. "moniliforme"* (Meredith, 1965; Herrera Dávila, 2005), *F. "roseum"* y *F. "semitectum"*. Estas y otras especies de *Fusarium* junto a otros agentes fúngicos (*Colletotrichum musae*, *V. theobromae*, *Botryodiplodia theobromae*) causan la podredumbre de la corona (Vintimilla y Ávila Segura, 2001; Castelló *et al.*, 1986).

2.5.2.3 *Deightoniella torulosa* (Syd) Ellis

D. torulosa causa distintas enfermedades como *deightoniella speckle* (conocida también como *swamp sopt* o *black tip*) y mancha de hojas (*leaf spot*) (Ploetz, 2003). Los conidióforos miden 35-70 µm de largo por 13-25 µm de ancho, son rectos o ligeramente curvados, los conidios piriformes a elipsoides, hialinos a color olivo con 3 a 6 pseudoseptos (Leiva Mora *et al.*, 2013) (Figura 12).

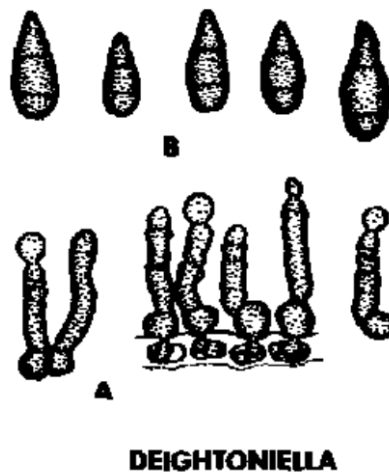


Figura 12: Ilustración de *D. torulosa* a) conidióforos y b) conidios. Imagen tomada de Barnett y Hunter (1998).

2.5.2.4 *Trachysphaera fructigena* Tabor and Bunting

La especie *T. fructigena* es un oomicete que a nuestro conocimiento no ha sido citada en el continente sudamericano (Baker *et al.*, 2008). Se caracteriza por un micelio blanco, hialino, su forma de propagación está constituida por diásporas esféricas y hialinas de 1 a 3 µm, con protuberancias prominentes (Figura 13) (Goujon, 1965).

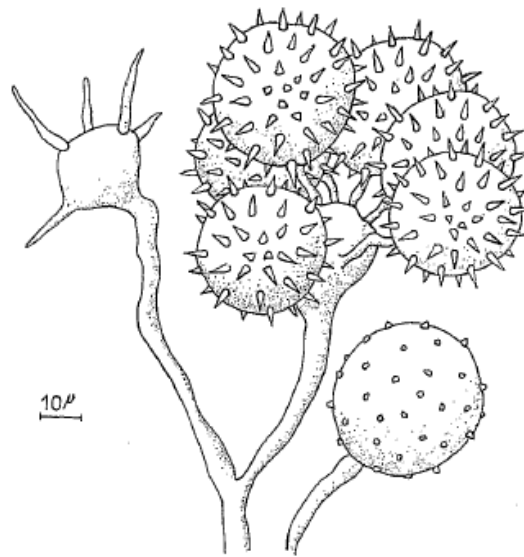


Figura 13: Vesículas y esporangios de *Trachysphaera fructigena* formados en la vaina de cacao contaminada en laboratorio. Imagen tomada de Goujon (1965).

2.5.3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad

V. theobromae fue la especie fúngica descrita originalmente infectando hojas de *Theobroma cacao*. Desde entonces esta ha sido citada como agente causal de la pudrición de punta de cigarro del plátano. La frecuencia de punta de cigarro se incrementa durante periodos de alta humedad y lluvia, con temperatura óptima de 25 °C y baja considerablemente durante la estación seca (Grajeda, 2001; Ploetz, 2003; Herrera Dávila, 2005; Mouliom Pefoura *et al.*, 2007; Snowden, 2010). La especie, hoy denominada *M. theobromae* es un colonizador de restos de hojas y flores de banana. Los conidios son diseminados por corrientes de aire e infectan la parte muerta de las flores (Ploetz, 2003). El patógeno primero coloniza el perianto de la banana saprofiticamente y solo ataca el fruto en etapas tardías (Meredith, 1965). En la figura 14 se esquematiza el ciclo de la enfermedad con información bibliográfica y con figuras propias de esta región.

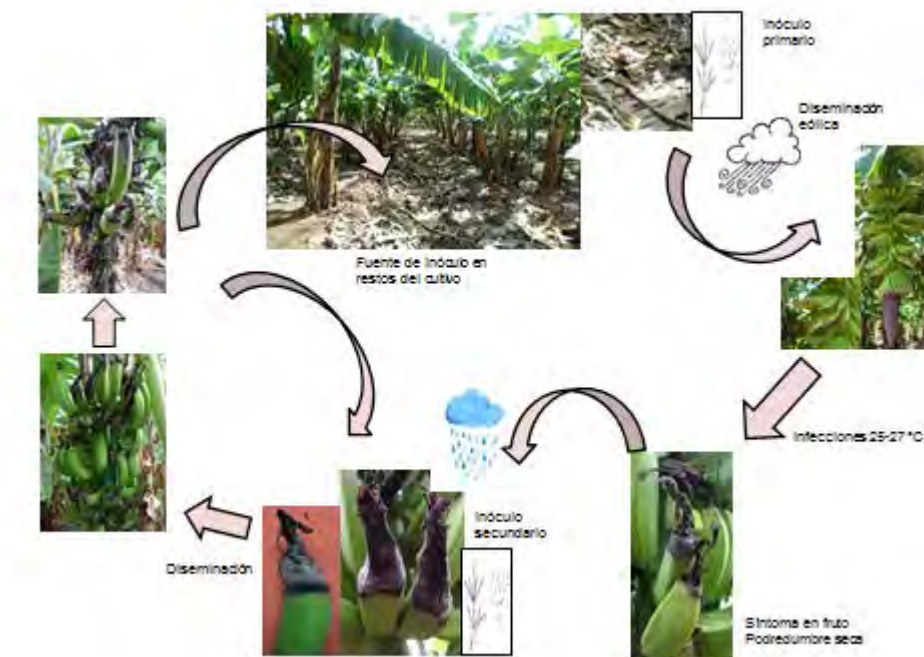


Figura 14: Ciclo de la enfermedad conocida como punta de cigarro. Esquema propio realizado según la información bibliográfica.

2.5.4 Manejo de la enfermedad

Para el manejo de la enfermedad se recomienda primero monitorear los frutos inmaduros. Como medidas preventivas se aconseja el uso de variedades resistentes como Gran Nanika, poda y eliminación de las plantas ya cosechadas para reducir fuentes de inóculo y humedad, que pueden crear las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, quitar los restos florales manualmente de los dedos 8-11 días después de la formación del racimo y descorazonar cuando las frutas empiezan a doblarse. Cubrir el racimo inmediatamente después de su emergencia con bolsas de polietileno también es efectivo.

Otras medidas preventivas son almacenar en lugar fresco y seco para reducir la incidencia de la enfermedad. En caso de observar frutas con síntomas proceder a retirar y enterrar las frutas infectadas para prevenir la esporulación y dispersión del hongo. Por último se recomienda el uso de distintos productos químicos como el grupo de los benzimidazoles o los fungicidas cúpricos (Ploetz, 2003; Herrera Dávila, 2005; Soto Ballester, 2008; Snowden, 2010; Maina *et al.*, 2013).

3. MATERIALES y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos planteados se procedió al relevamiento de las zonas productoras de banana en las provincias de Salta y Jujuy determinando así las fincas donde se realizó el muestreo en nuestro país.

3.1 Área de Muestreo

El muestreo se realizó en fincas pertenecientes a las provincias de Salta y Jujuy (Figura 15) ubicadas en la región fitogeográfica de las Yungas entre los 23° 27' y 22° 44' de latitud sur y 64° 47' y 64° 22' de longitud oeste (Tapia y Fagiani, 2009). Se relevó una superficie de 363 has entre ambas provincias, de las cuales 150 has corresponden a nueve fincas de la provincia de Jujuy en las localidades de Yuto (El Bananal) y Fraile Pintado, mientras que en Salta se muestrearon 213 has distribuidas en onces fincas de las localidades de Colonia Santa Rosa y zonas aledañas a San Ramón de la Nueva Orán.

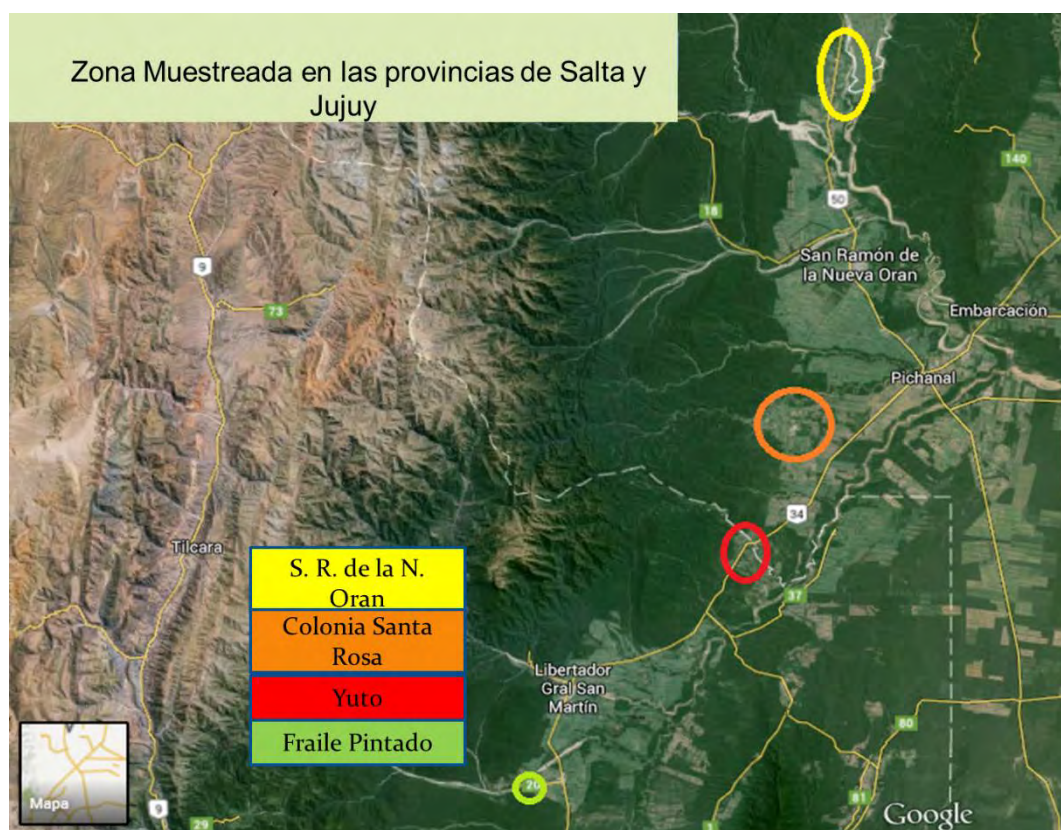


Figura 15: Zonas productoras de banana en las provincias de Salta y Jujuy. (Fuente: Imagen satelital tomada del google maps).

3.1.1 Método de muestreo

Por tratarse de una enfermedad cuarentenaria tipo A2 para nuestro país, se optó por usar el método “Completamente al azar” citado por Filho *et al.* (1995) y adaptado

para esta enfermedad. La adaptación consistió en hacer un barrido completamente al azar ya que provee la información necesaria para conocer la distribución espacial (dentro de unidades de producción como así también en la región en estudio) y la cuantificación de la misma en cada distribución. Este método consiste en tomar fincas al azar y recorrer el lote de manera alterna entre las filas, es decir ingresar entre la segunda y tercer fila, y observar en ambos lados los racimos de frutas verificando la presencia de fruta con sintomatología para su recolección. Una vez terminado el recorrido se saltean cinco filas (contando desde la cuarta fila) y se reingresa entre la novena y décima fila (Figura 16) así hasta completar el lote. Del total de la superficie de la finca se muestreó el 50 %.

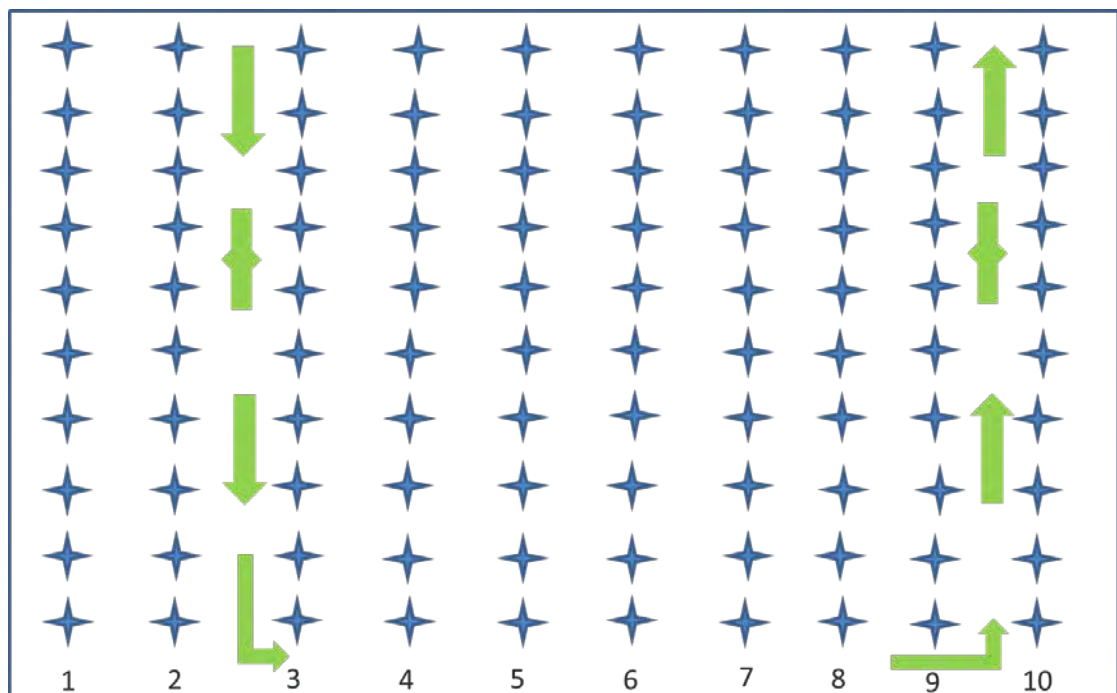


Figura 16: Diagrama de muestreo por barrido, adaptado de Filho *et al.* (1985). Las flechas muestran el recorrido dentro del lote, saliendo del espacio entre dos filas (“melga” o “trocha”), dejando cinco filas sin muestrear, para reingresar nuevamente entre dos filas y continuar con el muestreo, hasta completar el lote. Se observa hacia ambos lados del recorrido, la presencia de frutas con síntomas las dos filas aledañas, las que se extraen para el aislamiento de patógenos.

3.1.2 Recolección de Frutas

Se recolectaron frutas con los síntomas característicos de la enfermedad las que se identificaron por provincia, número de finca y número de fruta. Estas se acondicionaron individualmente en bolsas plásticas y se conservaron con geles congelantes en recipientes térmicos (conservadoras térmicas). Finalizado el muestreo diario se llevaron al laboratorio de la Estación Experimental de Cultivos Tropicales de

Yuto del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (E.E.C.T. de Yuto INTA) para su posterior tratamiento.

Con la información recopilada se calcularon la prevalencia y la incidencia. La prevalencia de la enfermedad se determinó como el “número de lotes con frutas enfermas sobre el número total de lotes muestreados”, y la incidencia tomando la “cantidad de plantas con frutas enfermas por lote sobre la cantidad total de plantas monitoreadas por lote”.

Las formulas empleadas fueron las siguientes:

Prevalencia	Incidencia
$\frac{\text{N}^\circ \text{ de lotes con frutas enfermas} * 100}{\text{N}^\circ \text{ total de lotes muestreados}}$	$\frac{\text{Cantidad de plantas con frutas enfermas} * 100}{\text{Cantidad total de plantas monitoreadas}}$

3.2 Aislamiento de hongos a partir de frutas con síntomas

Las frutas recolectadas se esterilizaron superficialmente con algodón embebido en alcohol etílico (96 °). A partir de la punta con pudrición seca se tomaron trocitos de tejido afectado (zona entre tejido sano y enfermo). Estos tejidos se desinfectaron con hipoclorito de sodio (al 1 % de Cl activo) durante 60 segundos con posterior enjuagado con agua destilada estéril (ADE) y secado en papel secante estéril. Seis de estos trocitos se sembraron en una caja de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo los medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD – Anexo IV) y Agar Alcohol (AA – Anexo IV) medio selectivo para *Verticillium*. Las colonias que crecieron a partir de los tejidos sembrados se repicaron a cajas de Petri conteniendo APD. Todos los procedimientos se realizaron por triplicado. La incubación se realizó a 24 °C ± 2 en cámara de cultivo iluminada con tubos fluorescentes (OSRAM L30 W/10) durante 5 días.

Para obtener cultivos monospóricos de cada aislamiento, después de diez días de crecimiento se tomó una pequeña cantidad de micelio con conidios, con un asa de punta. A cada sección se le agregó dos gotas de ADE en una placa con APD, y con ayuda de una espátula de vidrio (Asa de Digralsky) se dispersó homogéneamente en la superficie del medio. Luego de 24 horas a temperatura de laboratorio (23 °C ± 2), con un microscopio óptico (aumento 40x) se identificó y extrajo un conidio germinado, el cual se transfirió a otra placa con APD. Estos cultivos monospóricos se preservaron en tubos picos de flauta con APD, en heladera a 4 °C, para su posterior uso en la inoculación de frutas para la prueba de patogenicidad e identificación. Se seleccionaron cultivos monospóricos que por características macroscópicas representaban grupos de aislamientos similares a los géneros *Alternaria*, *Fusarium*,

Colletotrichum y *Muscatillium* (Barnett y Hunter, 1998; Zare *et al.*, 2007). Estos aislamientos representativos se utilizaron en las pruebas de patogenicidad.

3.3 Pruebas de Patogenicidad

Todos los aislamientos se repicaron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con APD como medio de crecimiento y se incubaron a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$; durante 3 días *Fusarium* y *Alternaria* y 5 días *Muscatillium* y *Colletotrichum*. De la periferia de las colonias en activo crecimiento se extrajeron discos de 6 mm de diámetro para su utilización como inóculo.

Se recolectaron frutas de 60 días de desarrollo aproximadamente (Ram *et al.*, 1962; León Agatón y Mejía Gutiérrez, 2002) con bordes pronunciados a débilmente pronunciados (IPGRI-INIBAP/CIRAD, 1996). Doce horas antes de la inoculación las frutas se separaron del raquis fructífero para dejar fluir el látex. Para la inoculación se utilizó la metodología descrita por Masudi y Bonjar (2012). Se procedió a la desinfección superficial de las frutas, la cual consistió en: a) lavado con agua corriente y secado al aire libre, b) desinfección con alcohol 70 % y enjuagado con ADE; sumergiendo durante 2 minutos en hipoclorito de sodio (al 10 % de Cl activo), enjuagado con ADE y secado en cámara de flujo laminar.

Las metodologías de inoculación se muestran en la figura 17 y consistieron en:

1a) Herida más algodón estéril húmedo: en ambos extremos de cada fruta se hizo una herida de 2 mm de diámetro por 1-2 mm de profundidad con un ansa de punta. Sobre cada herida se colocó un disco de APD de 6 mm de diámetro con el patógeno, el cual se cubrió con algodón estéril embebido en 2 ml de ADE, además se usó papel film para sujetar el algodón y crear un ambiente de humedad constante. Las frutas se colocaron dentro de bandejas de plástico con tapa, esterilizadas con alcohol 70 %, además se las puso sobre placas de Petri estéril para evitar el contacto con la base de la bandeja.

1b) Herida más algodón estéril seco: esta metodología fue similar a *1a* con la diferencia que se usó algodón seco estéril para cubrir el disco de APD conteniendo el patógeno.

2a) Herida más alta humedad relativa: se procedió de forma similar a *1a* y *1b*. En este caso no se usó algodón sino una caja de Petri de 55 mm de diámetro con 10 ml de agua destilada estéril para generar una humedad relativa >90 % dentro de la bandeja.

2b) Herida con baja humedad relativa: la metodología de inoculación fue la misma que para *1a*, *1b* y *2a* con la diferencia que no se puso agua destilada estéril dentro de

la bandeja como se hizo en 2a. Por lo tanto se consideró un microambiente con baja humedad relativa.

3a) *Inoculación sin herida más alta humedad relativa*: en este caso no se realizó ningún tipo de herida en la fruta. Los discos de APD con inóculo se colocaron en los extremos de la fruta. Como en 2a se agregó ADE para generar una alta humedad relativa dentro de la bandeja.

3b) *Inoculación sin herida con baja humedad relativa*: similar a 3a salvo que no se colocó ADE dentro de la bandeja.

Se incluyó un testigo con las mismas condiciones de inoculación y de humedad pero solo con disco de medio APD sin patógeno. Las bandejas de cada metodología de inoculación se incubaron durante 21 días en un ambiente climatizado con 24 horas de luz y con una temperatura que varió entre 23 °C y 26 °C. El experimento se repitió dos veces más, una con las mismas condiciones descritas anteriormente y la otra se realizó en oscuridad total, es decir, cada bandeja dentro de una bolsa negra de polietileno y con las mismas condiciones de luz y temperatura.



Figura 17: Metodologías de inoculación en bananas sanas: 1a) Herida más algodón estéril húmedo, 1b) Herida más algodón estéril seco, 2a) Herida más alta humedad relativa, 2b) Herida con baja humedad relativa, 3a) Inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) Inoculación sin herida con baja humedad relativa.

La evaluación consistió en calcular la severidad como el volumen (mm^3) de la necrosis basal y apical siguiendo las formulas propuestas por Sorenson y Sparks (1980) según:

- Cuando la profundidad fue mayor que la mitad del diámetro:

$$VP = \pi * d^2 * (p - 0.1 * d) / 4$$
- Cuando la profundidad fue menor que la mitad del diámetro:

$$VP = \pi * p * (p^2 + 0.75 * d^2) / 5$$

- Cuando la profundidad fue igual a la mitad del diámetro se utilizó una u otra fórmula.

VP: volumen de pudrición, d: diámetro de la pudrición, y p: profundidad de la pudrición.

Los seis métodos de inoculación y el control sin inóculo se organizaron en un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones. La unidad experimental fue una fruta. Los experimentos de inoculación se repitieron tres veces. Se realizó un análisis de la varianza con el programa Infostat tomando como variable dependiente al volumen necrosado de la fruta y variables independientes a las metodologías de inoculación (tratamientos) y los aislamientos fúngicos. Para cada análisis se hicieron comparaciones de medias por LSD Fisher.

A partir de los frutos que manifestaron síntomas se tomaron tejidos enfermos con el propósito de volver a aislar los hongos inoculados. La metodología de aislamiento fue la misma que se describió anteriormente (sección 3.2), para cumplir con los postulados de Koch (Agrios, 1991). Los aislamientos que resultaron positivos en las pruebas de patogenicidad y postulados se usaron para las caracterizaciones correspondientes.

3.4 Crecimiento *in vitro* y caracterización morfológica de los aislamientos fúngicos

3.4.1 Crecimiento *in vitro* a distintas temperaturas y caracterización morfológica macroscópica

Los aislamientos conservados en tubos con APD en pico de flauta, se trasladaron desde el laboratorio de la EECT, INTA Yuto al laboratorio de Patología Vegetal de la Unidad Integrada Balcarce (UIB), donde se reactivó el crecimiento en cajas de Petri de 9 mm de diámetro con APD + cloranfenicol (Anexo IV). A partir de cada colonia en pleno crecimiento se tomaron discos de APD de 6 mm de diámetro para repicarlos por triplicados en cajas de Petri con el mismo medio de cultivo (divididas en cuatro cuartos) con el propósito de realizar mediciones diarias de crecimiento. Estas placas se incubaron a distintas temperaturas (16 °C, 23 °C, 27 °C y 35 °C) durante 10 días en cámara de crecimiento (Peet Lab – Instrumentalia con quince tubos fluorescentes FSL T8 36W/765 YZ35RR 7L14 luz de día, distribuidos de a cinco en ambos lados y en la puerta), con 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Para valorar la tasa de crecimiento diaria de cada aislamiento, en el reverso de cada cuarto de cada caja, todos los días a la misma hora, se marcó el crecimiento logrado. Al final de los 10 días se realizaron las mediciones diarias en mm. La tasa de crecimiento de cada aislamiento resultó del promedio de las tres repeticiones del crecimiento diario. Además se evaluó el color de

la colonia (reverso-anverso) (Tabla de colores A y B – IPGRI-INIBAP/CIRAD, 1996) y la forma (Guía de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNJu).

3.4.2 Caracterización micromorfológica de *Fusarium* y *Musicillium*

Para los aislamientos de *Fusarium* se observó presencia o ausencia y características de los conidióforos, macroconidios y microconidios, utilizando la técnica de microcultivo descrita por Leslie y Summerel (2006), con modificaciones. La técnica consistió en colocar un trozo de Agar Hoja de Clavel (AHC) de 1 cm² por 3 mm de espesor, en el centro de un porta-objeto estéril. Previamente, las hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) se cosecharon en estado juvenil en activo crecimiento y sin residuos de agroquímicos. Las hojas se cortaron en trocitos de aproximadamente 5 mm² y se secaron a estufa a 50 °C durante 2 h quedando las hojas verdes y crespas. Los trocitos de hojas se colocaron en un frasco de vidrio con tapa y se esterilizaron con óxido de propileno (OP). Se colocó 1 ml de OP por cada cuarto de envase que ocuparon las hojas (Fisher *et al.*, 1982). El medio de AHC se preparó colocando algunos trocitos de hojas de clavel en cajas de Petri con agar agua (Anexo IV) a temperatura de 45 °C. El medio de cultivo se inoculó en cada una de sus esquinas con una pequeña cantidad del hongo, colocando seguidamente un cubre objeto estéril. Los preparados se ubicaron en cámaras húmedas (cajas de Petri con algodón embebido en ADE) y se incubaron en estufa a 25 °C hasta el desarrollo del micelio, entre 24 a 36 h. Con ayuda de un microscopio óptico (OLYMPIKUS BX51) y usando el programa (Image-Pro Express 6.0) se midió el largo de 30 conidióforos, y el largo y ancho de 30 macroconidios y 30 microconidios.

Para la identificación del género *Musicillium* se siguieron las características descritas por Zare (2003), Zare *et al.* (2007) y Masudi y Bonjar (2012): color gris-marrón en el centro de la colonia, ausencia de clamidosporas, número de fiálides e hifas torulosas que en algunos casos forman microesclerocios.

3.4.3 Caracterización molecular de *Musicillium*

El estudio molecular se realizó con los aislamientos que resultaron positivos después de la prueba de patogenicidad. La determinación del agente causal se hizo mediante RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) con *Hae* III e *Hinf* I, detección del gen β -tubulina y digestión con *Alu* I, *Hinf* I y *Cfo* I y digestión del mtDNA con *Hae* III (Zare, 2003).

3.4.3.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de los aislamientos que por morfología se identificaron como *M. theobromae* (F*01C3b, F39C1, F20C4), más dos cepas de *V. dahliae* (Colón y América). Estas últimas cepas fueron los controles del género *Verticillium*, ya que no se contó con un ADN de *M. theobromae* como control positivo. Los cultivos fúngicos se hicieron crecer en medio líquido Extracto de Malta (Anexo IV) a 23 °C, en agitación constante a 120 rpm durante 10 días. El micelio fue recolectado y almacenado a -20 °C hasta la ruptura mecánica con nitrógeno líquido. El producto de la molienda mecánica se sometió al proceso de extracción de ADN (Clemente *et al.*, 2017). Se dispusieron 250 mg de micelio pulverizado en un tubo eppendorf de 2 ml, se agregaron 700 µl de Tampón de Rotura (ver Anexo IV), y se agitó por vórtex durante 15 segundos. Luego se agregaron 700 µl de Buffer Saturado de Fenol (Invitrogen) y se agitó en vórtex brevemente. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 minutos a 14000 rpm, se recuperó la fase acuosa y se agregaron 900 µl de Fenol-Cloroformo Isoamyl Alcohol (CIA) (24:1, v:v), a razón de 450 µl de cada uno. Se centrifugó a temperatura ambiente 10 minutos a 14000 rpm para recuperar la fase acuosa y se agregaron 900 µl de CIA. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 14000 rpm y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ADN 1 hora a temperatura ambiente con 900 µl de Isopropanol y se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a 14000 rpm. Se arrojó el Isopropanol y se lavó el precipitado durante 5 minutos con 500 µl de Etanol 70 %. Por último se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13000 rpm, se extrajo el Etanol y se dejó secar el precipitado por 30 minutos a 30 °C. Los precipitados fueron re-suspendidos en 50 µl de Tampón EDTA.

Se analizó la cantidad y calidad de la extracción de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa de baja densidad (0.7 % p:v, agarosa:buffer TAE) con 3.5 µl de Gelred Nucleic Acid Stain (0.0035 % v:v, colorante:gel agarosa), en una cuba de electroforesis (Biorad), con intensidad eléctrica de 40 Voltios durante los primeros cinco minutos y posteriormente una hora a 60 Voltios. Se incluyeron calles con el marcador e peso molecular de DNA del fago Lambda digerido con *Hind* III (Invitrogen). Se seleccionaron aquellas extracciones de ADN con la mayor intensidad de banda y sin evidencia de degradación (comprobable por ausencia del “chorreado” de ADN desde las bandas. Los ADN seleccionados se diluyeron (1:9, v:v, ADN concentrado: agua mili-Q).

3.4.3.2 PCR con primers específico para *V. dahliae*

Las reacciones de PCR se realizaron en un volúmen total de 25 µl (1X Buffer de PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada nucleótido, 0.5 µM de cada primer, 2 unidades

de *Taq* polimerasa/reacción), con volúmen de templado de 1 µl. Se utilizó el protocolo utilizado por Clemente *et al.* (2017), utilizando los primers VDFE1/ VDFE2 (*V. dahliae* Fragmento Específico). Las reacciones se realizaron en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (2 % p:v, agarosa:buffer TAE) que contenía el colorante Gelred Nucleic Acid Stain (0,0035 % v:v, colorante:gel de agarosa). Se incluyeron calles con el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen).

3.4.3.3 PCR con ITS1/ITS4 y digestión con las enzimas *Hae* III e *Hinf* I

En la identificación de *M. theobromae* se usaron primers ITS1 (Gardes y Bruns, 1993) y ITS4 (White *et al.*, 1990) para la amplificación de la región ITS en las muestras objetivos (F*01C3b, F39C1, F20C4) más cinco cepas de *V. dahliae* (América, América GC, Orense GC, Bragado GC y Colón) como controles de la especie y el control negativo con agua mili-Q. Para la PCR se hizo un mix de solución compuesta de 12.35 µl agua mili-Q, 2.5 µl buffer 10x, 3.75 µl Cl₂Mg, 2.5 µl dNTPs, 1.25 µl ITS1, 1.25 µl ITS4 y 0.4 µl *Taq* polimerasa. Este mix se fraccionó en tubos de 0.2 ml donde se agregó 1 µl de ADN molde de cada muestra, más dos cepas de *V. dahliae* (América y América GC) como controles de la especie y el control negativo.

Electroforesis de los productos de PCR: Se tomaron 10 µl de cada reacción de PCR y se agregaron 2 µl de Tampón de carga 6X. Se sembraron los 12 µl finales en un gel de agarosa 2 %, incluyendo calles con marcador de 100 pb (4 µl de dilución 100 ng/µl + 8 µl de Tampón de carga 1X). Cada gel se sometió a una electroforesis en tampón TAE 1X, a 40-60 Voltios durante aproximadamente 1.5-2 horas, vigilando el grado de avance de los colorantes (se prolonga la electroforesis hasta que el colorante más lento quede a la misma distancia del borde superior del gel que el más rápido respecto del borde inferior del gel). Los geles se tiñeron con GelRed Nucleic Acid Stain. Se observaron los resultados con luz ultravioleta en transiluminador (302 nm). Se fotografían y analizan los resultados obtenidos. Este proceso se repitió para todas las amplificaciones en PCR.

El producto de PCR obtenido se sometió a una digestión con enzimas de restricción (ER) *Hae* III y *Hinf* I con el protocolo del proveedor (PROMEGA R6171/R6201 respectivamente) modificando la concentración del ADN, el mix preparado fue el siguiente: 7.3 µl agua mili-Q, 2 µl Buffer MultiCore, 0.2 µl BSA, 10 µl de producto de

PCR, se mezcló bien y se agregó 0.5 µl de cada ER. Para observar si hubo digestión se hizo una electroforesis.

3.4.3.4 PCR para la detección del gen β -tubulina con Bt1a/Bt1b y digestión con las enzimas *Alu I*, *Hinf I* y *Cfo I*

Para la identificación del gen β -tubulina se amplificó con los primers Bt1a y Bt1b siguiendo el protocolo usado por Glass y Donaldson (1995) que consiste en: 12.35 µl agua mili-Q, 2.5 µl buffer 10x, 3.75 µl Cl_2Mg , 2.5 µl dNTPs, 1.25 µl Bt1a, 1.25 µl Bt1b y 0.4 µl *Taq* polimerasa. Este mix se fraccionó en tubos de 0.2 ml donde se agregó 1 µl de ADN molde de cada muestra (F*01C3b, F39C1, F20C4 y América, América GC más el testigo negativo). Con el producto de la PCR se hizo digestión con las ER *Alu I*, *Hinf I* y *Cfo I* (PROMEGA R6281/R6201/R6241), preparando una mix de solución de cada ER. El mix preparado fue el siguiente: 7.3 µl agua mili-Q, 2 µl Buffer MultiCore, 0.2 µl BSA, 10 µl de producto de PCR, se mezcló bien y se agregó 0.5 µl de cada ER. Mediante electroforesis se observó si hubo digestión de los productos de PCR.

3.4.3.5 Digestión con la enzima *Hae III* para el mtDNA

Por último, siguiendo el método usado por Kouvelis *et al.* (1999), para mtDNA RFLPs se digirió el ADN total con la ER *Hae III* (PROMEGA R6171): 16.3 µl agua mili-Q, 2 µl Buffer MultiCore, 0.2 µl BSA, 1 µl ADN de cada muestra, mezclado del mix y 0.5 µl de ER. Todas las muestras se incubaron a 37 °C por 4 horas en termociclador, finalizando con una corrida electroforética.

3.4.3.6 Análisis multivariado de los resultados de las pruebas moleculares

Con los resultados de las pruebas de digestión con las enzimas de restricción *Hae III* y *Hinf I* (sobre productos de PCR con primers ITS1/ITS4), *Alu I*, *Gfo I* e *Hinf I* (sobre productos de PCR con primers Bt1a y Bt1b para detectar el gen de β -tubulina) se realizó un análisis multivariado para constatar si los aislamientos estudiados formaban conglomerados de similitud al ser comparados con el conjunto de datos (Di Rienzo *et al.*, 2010). Las variables consideradas en el análisis fueron doce, registrando en cada caso ausencia/presencia de los productos de digestión esperados con cada una de las enzimas detalladas.

4. RESULTADOS

4.1 Área y método de muestreo: Prevalencia e Incidencia de la enfermedad

Entre diciembre de 2014 y enero de 2015 (datos climáticos de la zona para los años correspondientes, en la Figura 1 del Anexo III) se monitorearon 363 ha del cultivo de banano. En la provincia de Jujuy se muestrearon 150 ha, correspondientes a 30 lotes, pertenecientes a nueve fincas. Mientras que de la provincia de Salta se muestrearon 29 lotes (213 ha) distribuidos en 11 fincas. Entre ambas provincias se estimó que se cultivan 2500 ha en total, de las cuales 250 ha pertenecen a Jujuy y 2250 ha a Salta. Durante el muestreo se recolectó un total de 40 frutas (en distintos estados fenológicos) con los síntomas característicos de punta de cigarro (Figura 18).

Para cada provincia se determinó la prevalencia de la enfermedad. Mientras que para cada lote de cada finca donde se encontró frutas con síntomas se calculó la incidencia. La prevalencia calculada para Jujuy fue 6,9 %, y 23,3 % para Salta, promediando ambas provincias una prevalencia de 15 %. La incidencia de la enfermedad de los lotes de las fincas con frutas con síntomas se detalla en tabla 1.



Figura 18: a) Racimo de bananas afectadas por punta de cigarro y b) Fruta de banana con síntoma de punta de cigarro. Imágenes propias, frutas que fueron recolectadas en una finca ubicada en la provincia de Salta de donde se obtuvo el aislamiento de *Musicillium theobromae* F39C1.

Tabla 1: Incidencia (%) de punta de cigarro en nueve lotes de seis fincas de Jujuy y Salta donde apareció punta de cigarro (diciembre 2014/enero 2015).

Provincia	Finca N°	Lote N°	Incidencia (%)
Jujuy	1	1	0.06
		2	0.05
		3	0.17
	2	3	0.36
	4	1	0.06
		2	0.12
	5	2	0.02
Salta	10	1	0.04
	14	1	0.06

4.1.1 Aislamientos de hongos a partir de frutas con síntomas

Los géneros fúngicos *Fusarium*, *Musicillium*, *Colletotrichum* y *Alternaria*, se aislaron a partir de las 40 frutas recolectadas con los síntomas característicos de punta de cigarro. Se obtuvieron en total 140 aislamientos monospóricos, a partir de los cuales se seleccionaron inicialmente para la prueba de patogenicidad 10 aislamientos de *Fusarium*, 3 de *Musicillium*, 2 de *Colletotrichum* y 2 de *Alternaria* (Tabla 2).

Tabla 2: Código y origen de los aislamientos de *Fusarium*, *Musicillium*, *Colletotrichum* y *Alternaria*, usados en la primera prueba de patogenicidad.

Aislamientos	Origen		Géneros
	Provincias	Departamentos	
F19 C4	Jujuy	Ledesma	<i>Fusarium</i>
F13 C1	Jujuy	Ledesma	
F6 C6	Jujuy	Ledesma	
F25 C3a	Jujuy	Ledesma	
F16 C4	Jujuy	Ledesma	
F36 C2	Salta	Orán	
F24 C2b	Jujuy	Ledesma	
F2 C1	Jujuy	Ledesma	
F4 C2b	Jujuy	Ledesma	
F30 C1	Jujuy	Ledesma	
F20 C4	Jujuy	Ledesma	<i>Musicillium</i>
F*01 C3b	Salta	Orán	
F39 C1	Salta	Orán	
F24 C1	Jujuy	Ledesma	<i>Colletotrichum</i>
F12 C2	Jujuy	Ledesma	
F6 C4	Jujuy	Ledesma	<i>Alternaria</i>
F35 C2	Salta	Orán	

En la segunda y tercera repetición de las pruebas de patogenicidad se trabajó con 10 aislamientos que produjeron lesiones necróticas en las frutas inoculadas: 7 del género *Fusarium* (F19C4, F13C1, F16C4, F24C2b, F2C1, F30C1) y 3 del género *Musicillium* (F20C4, F39C1 y F*01C3b).

4.1.2 Pruebas de Patogenicidad

En el primer ensayo de inoculación los aislamientos F39C1 y F*01C3b mostraron diferencias significativas (p-valor 0.03) en el volumen del fruto necrosado basal respecto de los demás aislamientos (Figura 19) y entre las metodologías de inoculación, 2b se diferenció (p-valor 0.001) de las otras (Figura 20). En tanto que en la parte apical del fruto solo se registraron leves necrosis en el punto de inoculación y no se observó diferencias estadísticas entre los aislamientos inoculados (Anexo I: Figuras 3, 4, 5 y 6).

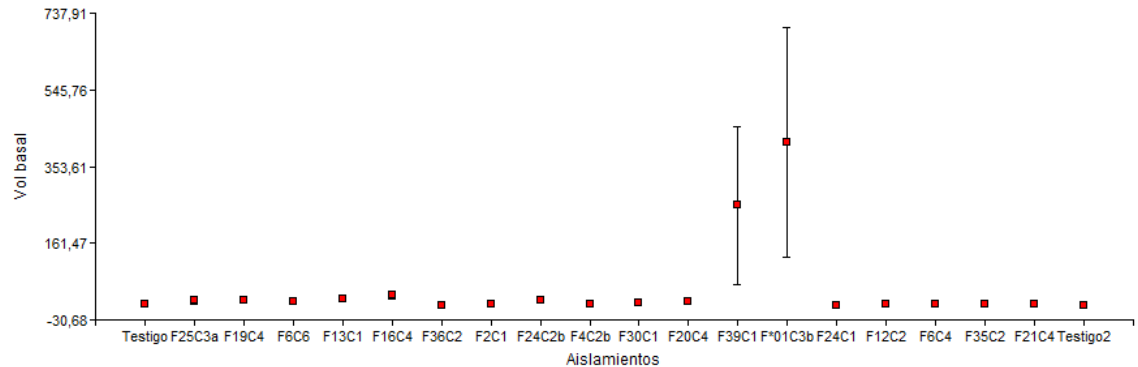


Figura 19: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) por los aislamientos inoculados: F25C3a, F19C4, F6C6, F13C1, F16C4, F36C2, F2C1, F24C2b, F4C2b, F30C1, F20C4, F39C1, F*01C3b, F24C1, F12C2, F6C4, F35C2, F21C4 y Testigo 1 y 2.

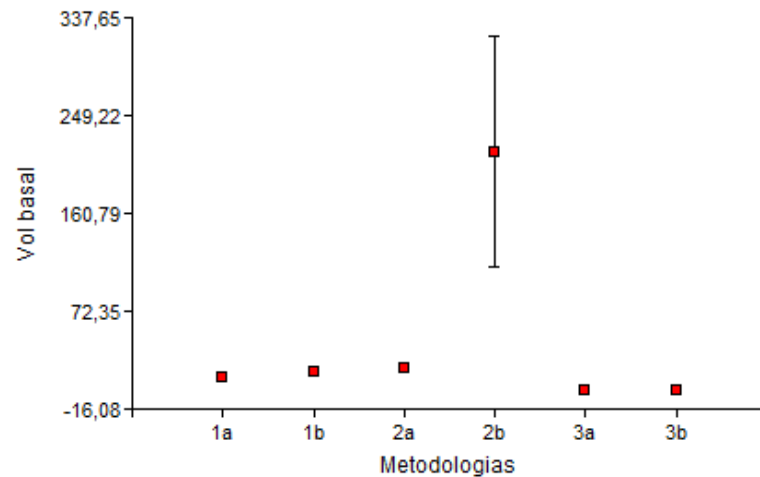


Figura 20: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) para las metodologías de inoculación: 1a) herida más algodón estéril húmedo, 1b) herida más algodón estéril seco, 2a) herida más alta humedad relativa, 2b) herida con baja humedad relativa, 3a) inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) inoculación sin herida con baja humedad relativa.

En la segunda repetición del ensayo, las frutas inoculadas en el extremo basal con los aislamientos F39C1 y F*01C3b presentaron síntomas característicos, mostrando diferencias significativas con los demás aislamientos. Aquí el p-valor (0.07) fue mayor al α (0.05), donde se puede observar que F39C1 se diferenció de los demás aislamientos en las comparaciones de medias (Figura 21). Nuevamente se obtuvo diferencias estadísticas (p-valor 0.002) para la metodología de inoculación 2b (Figura 22). Como en la primera prueba, las inoculaciones en el extremo apical de las frutas no manifestaron diferencias estadísticas del volumen necrosado entre aislamientos. (Anexo I: Figuras 9, 10, 11 y 12).

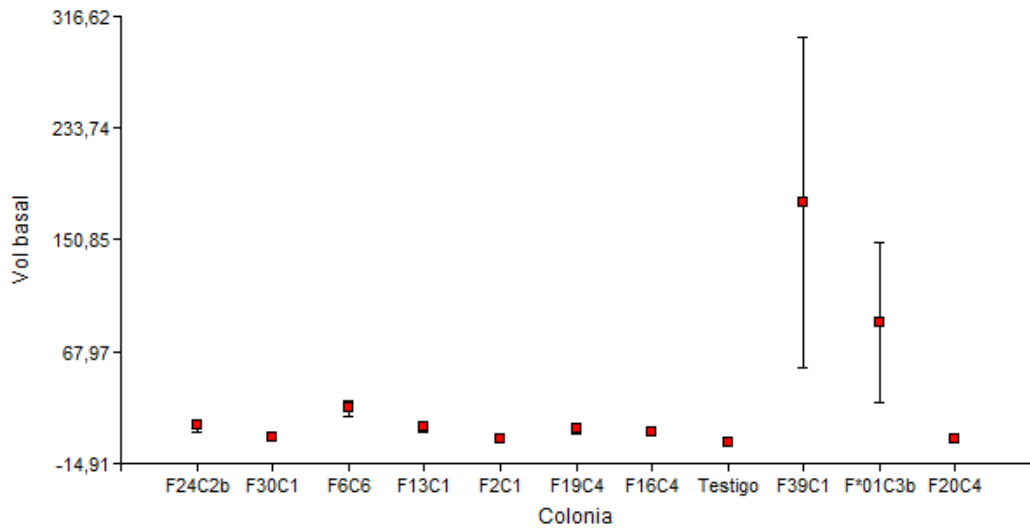


Figura 21: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) por los aislamientos inoculados: F24C2b, F30C1, F6C6, F13C1, F2C1, F19C4, F16C4, Testigo, F39C1, F*01C3b y F20C4.

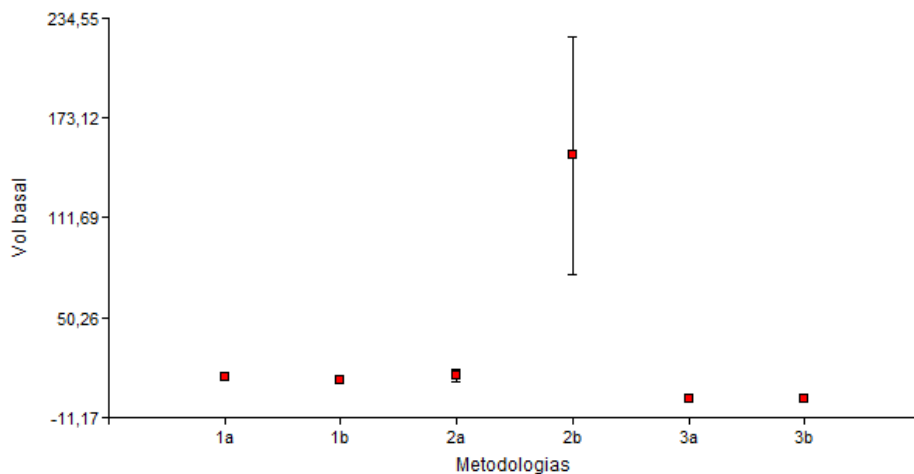


Figura 22: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) para las metodologías de inoculación: 1a) herida más algodón estéril húmedo, 1b) herida más algodón estéril seco, 2a) herida más alta humedad relativa, 2b) herida con baja humedad relativa, 3a) inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) inoculación sin herida con baja humedad relativa.

En la tercera repetición del ensayo, el aislamiento F20C4 reprodujo los síntomas en el extremo basal en una de las tres frutas inoculadas. En este caso, el análisis de la varianza arrojó un p-valor de 0.36 muy superior al α (0.05), sin embargo en las comparaciones de medias del ANOVA (Figura 13 del Anexo I), F20C4 se diferencia de los demás aislamientos, mientras que gráficamente (Figura 23) esta diferencia no es apreciable, debido a un coeficiente de variación muy alto (375.78). La metodología de inoculación 2a fue la que expresó el síntoma característico de la enfermedad, diferenciándose de las demás metodologías (Figura 24). Para el volumen apical necrosado se detalla el análisis estadístico en el Anexo I: Figuras 15, 16, 17 y 18.

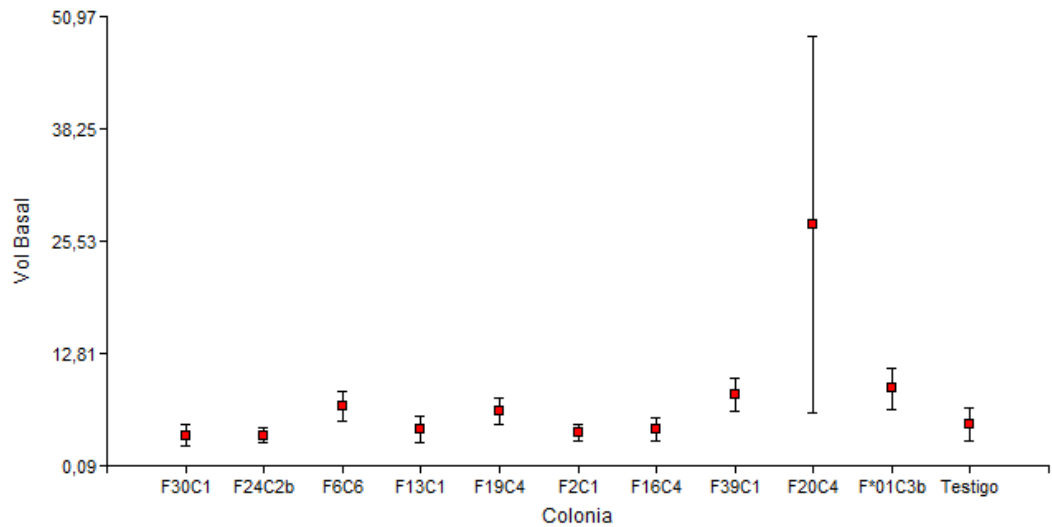


Figura 23: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) por los aislamientos inoculados: F30C1, F24C2b, F6C6, F13C1, F19C4, F2C1, F16C4, F39C1, F20C4, F*01C3b y Testigo.

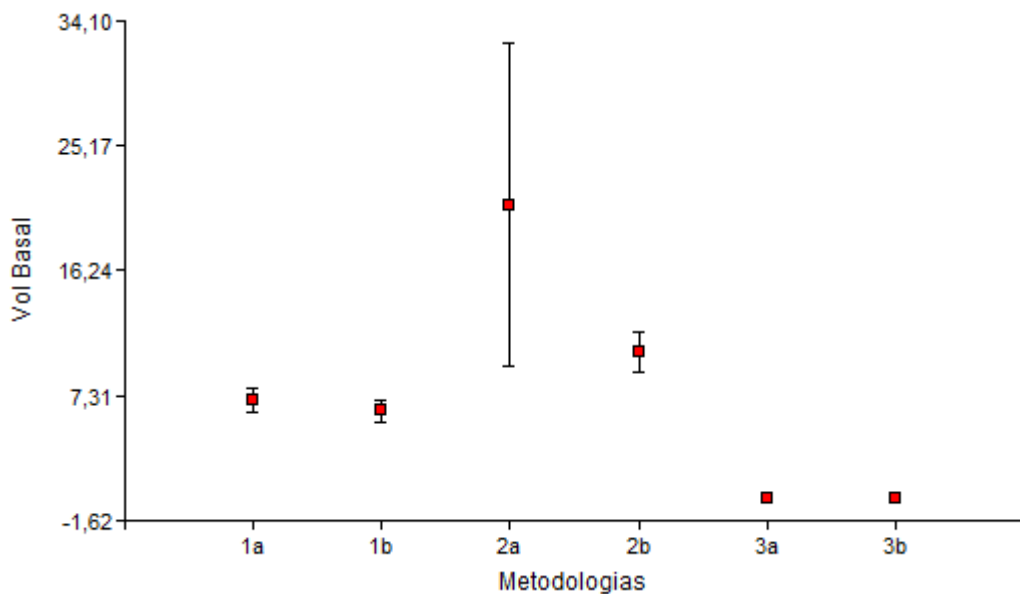


Figura 24: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen basal necrosado (mm^3) para las metodologías de inoculación: 1a) herida más algodón estéril húmedo, 1b) herida más algodón estéril seco, 2a) herida más alta humedad relativa, 2b) herida con baja humedad relativa, 3a) inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) inoculación sin herida con baja humedad relativa.

A partir de las frutas que manifestaron los síntomas característicos de la enfermedad, se reaislaron colonias con las mismas características de los aislamientos originales, cumpliéndose así los postulados de Koch. A partir de las frutas inoculadas con *Fusarium* que solamente produjeron necrosis alrededor de la herida también se reaisló y se completaron los postulados de Koch (Figura 25).

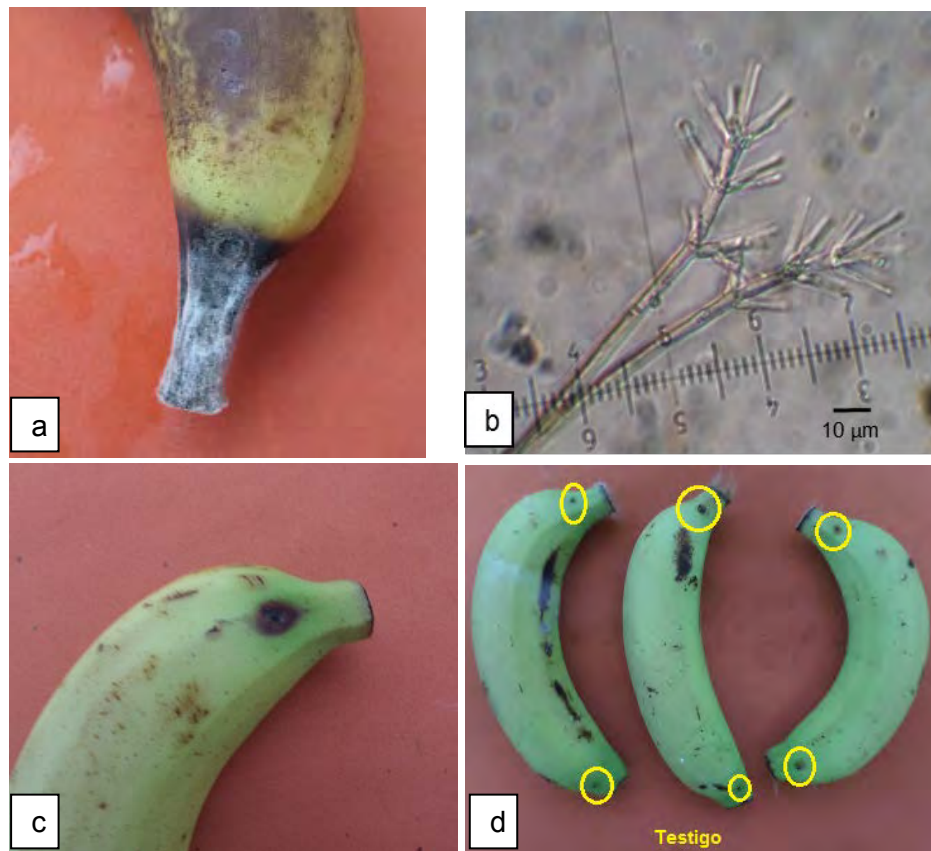
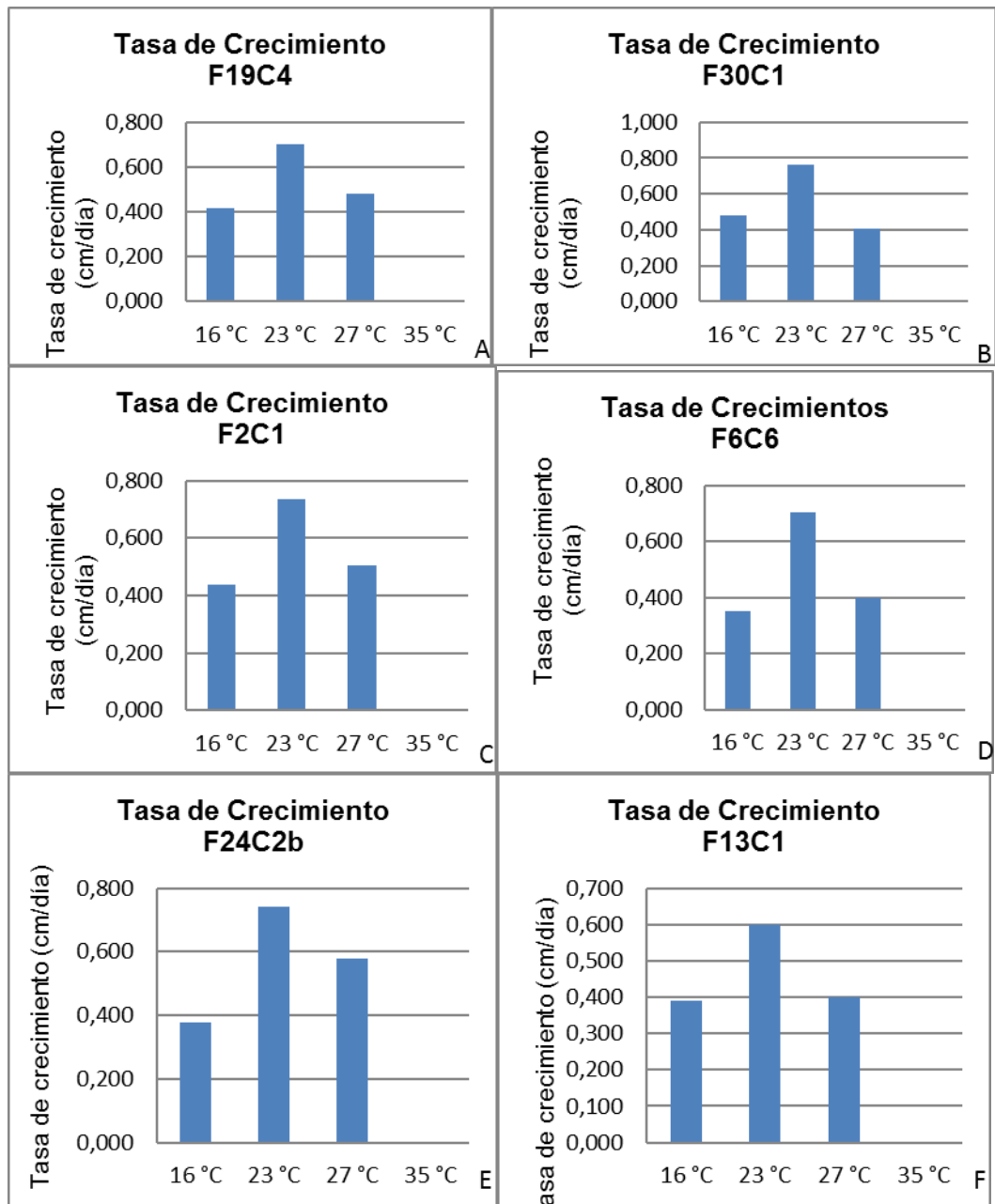


Figura 25: a) Banana con síntoma inoculada con el aislamiento F39C1. b) Conidióforos y fiálides (400x) de *Musicillium theobromae* tomados de la superficie de una fruta con síntomas de punta de cigarro. c) Banana con necrosis producida por *Fusarium* y d) Frutas sin síntomas (control) del método 1a. Las imágenes a) y c) muestran frutas que fueron inoculadas por el método 2b.

4.2 Crecimiento *in vitro* y caracterización de los aislamientos fúngicos

4.2.1 Crecimiento *in vitro* a distintas temperaturas y caracterización macro y micromorfológica de *Fusarium* y *Musicillium*

Para cada aislamiento inoculado se evaluó la tasa de crecimiento a 16, 23, 27 y 35 °C. Después de 10 días de crecimiento se calculó la tasa de crecimiento de cada aislamiento como el promedio de cada cuadrante de cada caja de Petri y a su vez el promedio de las tres cajas usadas como repetición. Se observó que la temperatura óptima de crecimiento de todos los aislamientos inoculados fue 23 °C, mientras que en la máxima temperatura 35 °C, el crecimiento fue nulo para los hongos ensayados (Figura 26. A, B, C, D, E, F, G, H, I y J).



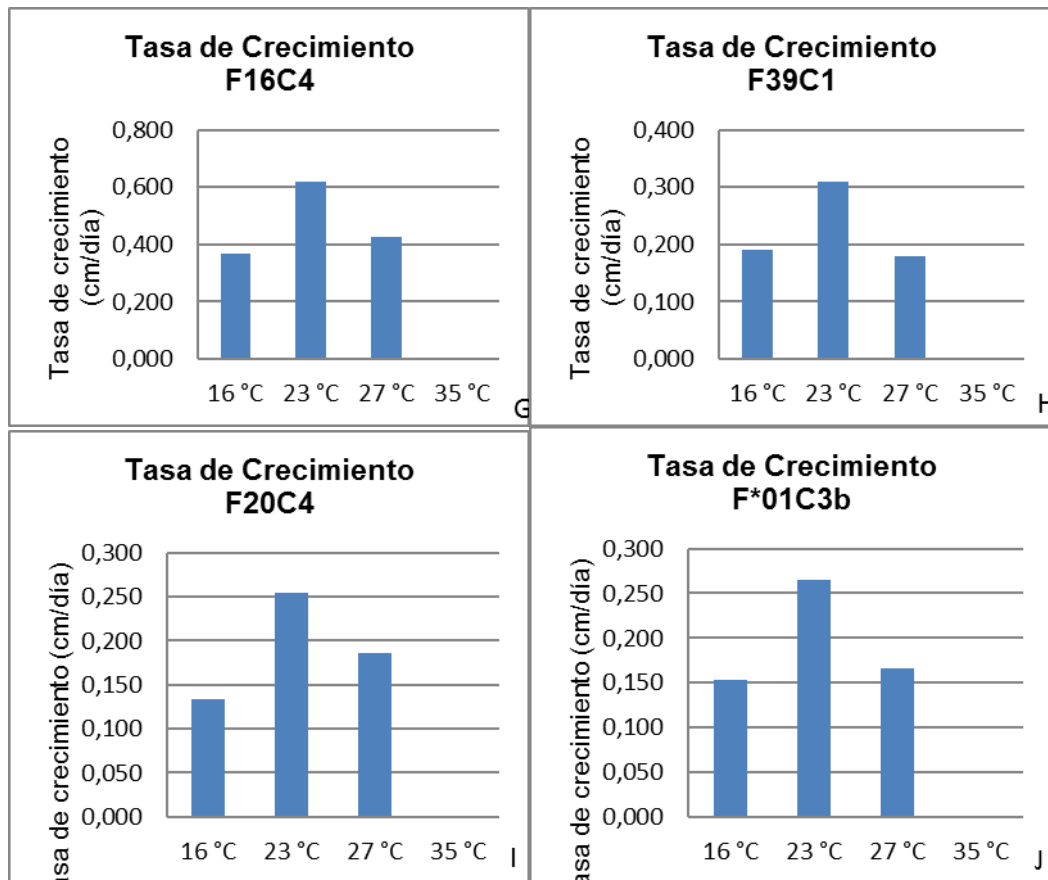


Figura 26: Tasas de crecimiento (cm/día) de los aislamientos estudiados en medio APD+cloranfenicol a temperaturas 16 °C, 23 °C, 27 °C y 35 °C. A) F19C4, B) F30C1, C) F2C1, D) F6C6, E) F24C2b, F) F13C1, G) F16C4, H) F39C1, I) F20C4 y J) F*01C3b.

El aspecto de los aislamientos fúngicos después de 10 días de crecimientos a 23 °C se muestra en las figuras 27 A, B, C, D, F, G, H, I y J. Estos aislamientos (F19C4, F30C1, F2C1, F6C6, F24C2b, F13C1, F16C4, F39C1, F20C4 y F*01C3b) se caracterizaron macro y micromorfológicamente, para identificar las especies de *Fusarium* y *Mucillium*. Se utilizaron las claves dicotómicas propuestas por Booth (1971, 1977) y (Zare, 2003; más la información brindada por Zare *et al.*, 2007; Masudi y Bonjar, 2012), respectivamente. Los aislamientos que resultaron positivos en la prueba de patogenicidad se caracterizaron además molecularmente. Las especies de *Fusarium* identificadas con las medidas de conidios (macro y micro), conidióforos, tasa de crecimiento, color y forma de las colonias fueron para F2C1: *F. semitectum*, F13C1: *F. oxysporum*, F19C4: *F. verticillioides* (Figura 28 A, B y C), mientras que con los demás aislamientos (F6C6, F24C2b, F30C1, F16C4) se llegó solamente al género porque las medidas de las estructuras de estos aislamientos se compartían con otras especies causando confusión a la hora de adjudicarle la especie (ANEXO II Tabla 1).

Los aislamientos F39C1, F*01C3b y F20C4 presentaron en el centro de la colonia un color gris-marrón micelio torulosos y estructuras semejantes a microesclerocios, 3 a 5 verticilos con tres fiálides y abundantes microconidios (Figura 28 D, E y F). En la tabla 2 del Anexo II se muestran los promedios de las mediciones de los aislamientos F*01C3b, F39C1 y F20C4. Se midió el largo de conidióforos, de fiálides y de conidios que resultaron para F*01C3b 400 μm , 22 μm y 5.30 μm , para F39C1 375 μm , 26.13 μm y 5.31 μm y para F20C4 380 μm , 25.73 μm y 5.28 μm respectivamente. Los conidios observados siempre se presentaron agrupados en falsas cabezas en el ápice de cada fiálide como fue descrito por Zare, 2003; Zare et al., 2007; Masudi y Bonjar, 2012. De modo que los aislamientos F39C1, F*01C3b y F20C4 se caracterizaron como *M. theobromae*.

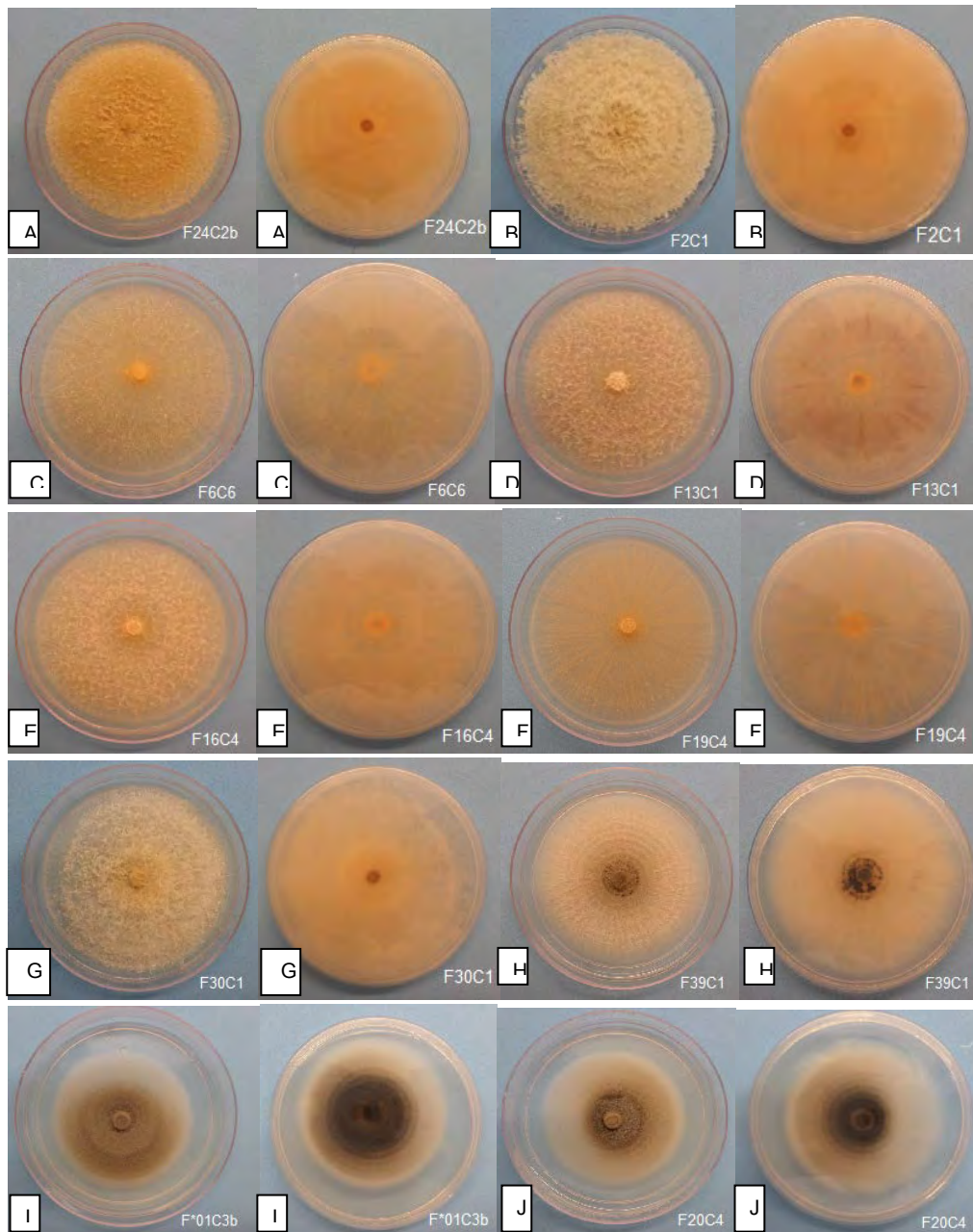


Figura 27: Anverso y reverso de los aislamientos fúngicos crecidos en APD durante 10 días a 23 °C. A) F24C2b: *Fusarium* sp., B) F2C1: *F. semitectum*, C) F6C6: *Fusarium* sp., D) F13C1: *F. oxysporum*, E) F16C4: *Fusarium* sp., F) F19C4: *F. verticillioides*, G) F30C1: *Fusarium* sp., *Musicillium theobromae* H) F39C1, I) F*01C3b, y J) F20C4.

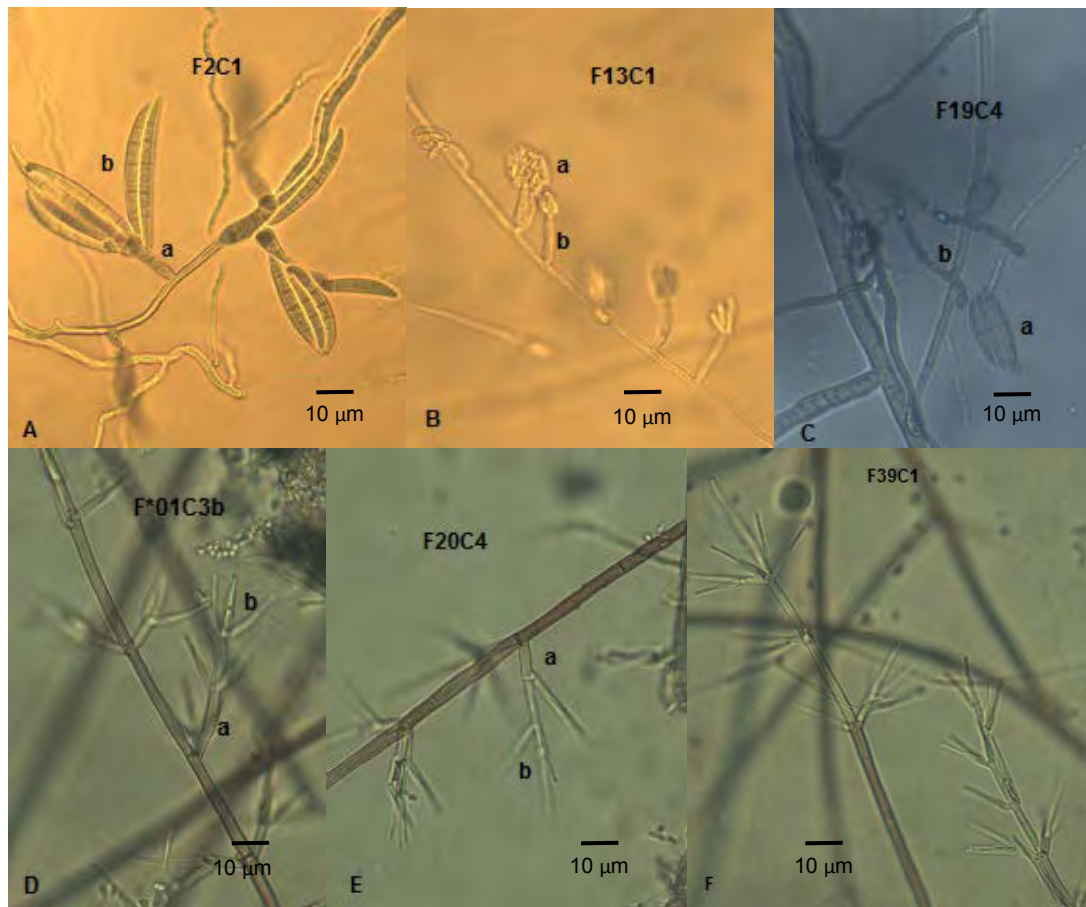


Figura 28: A) F2C1: *Fusarium semitectum*, a: conidióforo, b: macroconidios. B) F13C1: *F. oxysporum*, a: microconidios agrupados en falsas cabezas, b: microconidioforos. C) *F. verticillioides*, a: macroconidios septados, b: microconidios en cadenas. *Musicillium theobromae*: D) F*01C3b y E) F20C4: a: conidiofóro, b: fialides, y F) verticilos. Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento de 400x.

4.2.2 Caracterización molecular de *Musicillium*

4.2.2.1 Extracción de ADN

El ADN obtenido a partir de los aislamientos F39C1, F*01C3b, F20C4, y de las cepas de *V. dahliae* (Colón y América) fue calidad apropiada para las pruebas subsiguientes de PCR y las digestiones. Las bandas de mayor intensidad y con menor degradación (evidencia por la ausencia de “chorreado” en la electroforesis) fueron seleccionadas. En la Figura 29 se muestran las extracciones seleccionadas, las cuales fueron la calle 4 (ADN del aislamiento F*01C3b), calle 5 (ADN del aislamiento F39C1), calle 8 (ADN del aislamiento F20C4) y calle 11 (ADN de la cepa América de *V. dahliae*).

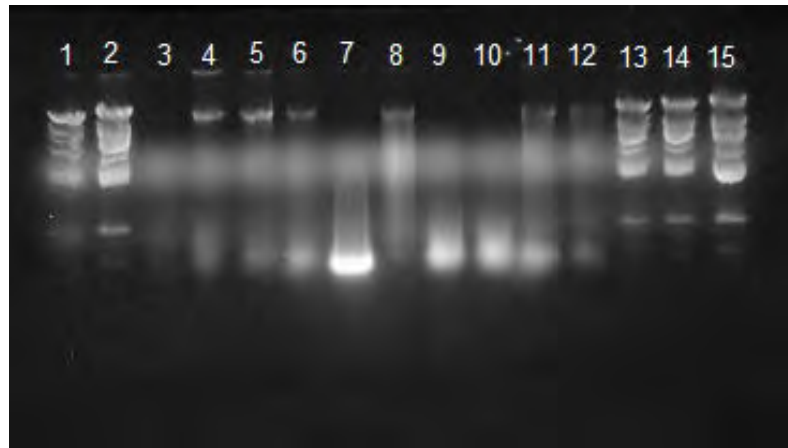


Figura 29: Resultados de la electroforesis para evaluar la calidad del ADN extraído. Referencias: 1, 2, 13, 14 y 15, marcador λ DNA *Hind* III (1, 5, 2.5, 7.5 y 10 μ l respectivamente); 3 a 12, extracciones de DNA: 3 y 4 aislamiento F*01C3b, 5 y 6 aislamiento F39C1, 7 y 8 aislamientos F20C4, 9 y 10 cepa Colón de *Verticillium dahliae*, 11 y 12 cepa de América de *V. dahliae*.

4.2.2.2 PCR con primers específicos para *V. dahliae*

Las muestras de ADN seleccionadas se sometieron a reacciones de PCR con primers específicos para *V. dahliae* (VDFe1 y VDFe2) para comprobar que no pertenecieran al género *Verticillium*. La Figura 30 muestra que los controles positivos de la especie de *V. dahliae* (América, Orense, Bragado y Colón) amplificaron como se esperaba, mientras que la muestra F20C4 amplificó con los primers para *Verticillium*. Esta respuesta de la muestra F20C4 se evaluó nuevamente (en tres diluciones de ADN) para comprobar si efectivamente amplificaba con los primers para *V. dahliae*, obteniendo bandas en las reacciones con ADN concentrado y en el diluido 1/10 como se observa en la Figura 31.

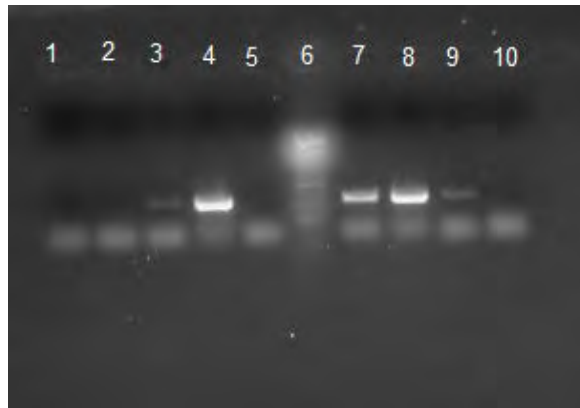


Figura 30: Productos de reacciones con primers específicos para *Verticillium dahliae*. Referencias: 1, aislamiento F*01C3b; 2, aislamiento F39C1; 3, aislamiento F20C4; 4 y 5, cepa América de *V. dahliae*; 6, marcador 100 bp; 7 a 9, cepas de *V. dahliae*: cepas Orense, Bragado y Colón respectivamente; 10, control negativo de la reacción.

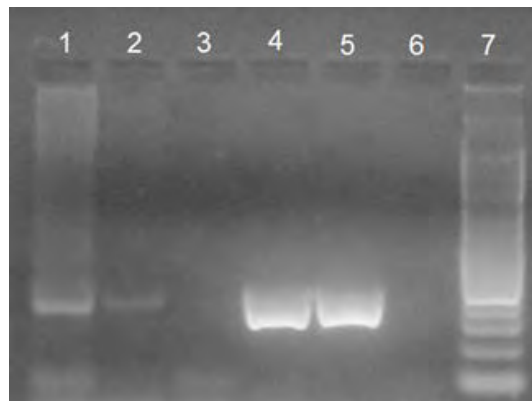


Figura 31: Productos de PCR de reacciones con primers específicos para *Verticillium dahliae*. Referencias: 1 a 3, aislamiento F20C4 (ADN sin diluir, diluido 1/10 o 1/100 respectivamente); 4 y 5, cepa América de *V. dahliae* (ADN diluido 1/10); 6, control negativo de la reacción; 7, marcador 100 bp.

4.2.2.3 PCR con ITS1/ITS4 y digestión con las enzimas *Hae* III e *Hinf* I

El ADN de los aislamientos F39C1, F*01C3b y F20C4, junto al de las cepas de *V. dahliae* se sometió a reacciones de PCR con primers ITS 1 e ITS 4. Se obtuvieron productos de PCR de entre 500 y 600 pb (Figura 32). Estos productos se utilizaron luego para la digestión con las enzimas de restricción.

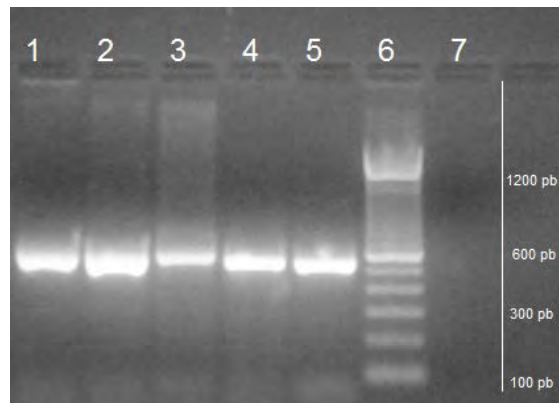


Figura 32: Productos de PCR de reacciones con primers ITS 1 e ITS 4. Referencias: 1, aislamiento F*01C3b; 2, aislamiento F39C1; 3, aislamiento F20C4; 4 y 5, cepa América de *Verticillium dahliae*; 6, marcador 100 bp; 7, control negativo de reacción.

Con el producto de PCR de la amplificación se procedió a la digestión con las ER *Hae* III e *Hinf* I para obtener el segmento específico de la especie *M. theobromae*. Dentro del mismo gel de agarosa se reiteró el procedimiento con los primers ITS1 e ITS4 para comprobar la correlación de la amplificación y la digestión de las muestras estudiadas. En la figura 33 se observa que la amplificación con los ITS1 e ITS4 es similar al resultado que se obtuvo en la repetición de la prueba, sin embargo, en la digestión con la ER *Hae* III se obtuvo fragmentos de ADN que van entre las 200 y 300 pb para las muestras a identificar, mientras que, con la ER *Hinf* I se obtuvo fragmentos de ADN que están entre las 300 y 400 pb para las muestras a identificar. En tanto, las cepas conocidas de *V. dahliae* presentan bandas de distintos peso molecular respecto a las muestras estudiadas.



Figura 33: Productos PCR con primers ITS 1 e ITS 4 y resultados de la digestión de esos productos. Referencias; 1 a 5, productos de PCR ITS1/ITS4: aislamientos F*01C3b, F39C1 y F20C4, cepa América de *Verticillium dahliae* y control negativo de reacción, respectivamente; 6 marcador 100 bp; 7 a 13, productos de digestión con *Hae* III, 14 a 20, productos de digestión con *Hinf* I: aislamientos F*01C3b, F39C1 y F20C4, dos cepas América de *V. dahliae*, control negativo de PCR ITS1/ITS4, control negativo de digestión respectivamente.

4.2.2.4 PCR para la detección del gen β -tubulina con Bt1a/Bt1b y digestión con las enzimas *Alu* I, *Hinf* I y *Cfo* I

Para la región β -tubulina, se usaron los primers Bt1a y Bt1b para amplificar el fragmento específico de la especie y digerir con las ER *Alu* I, *Cfo* I y *Hinf* I. Con el producto de PCR de la amplificación se procedió a la digestión. En un mismo gel de agarosa se realizó la electroforesis obteniendo las bandas de la amplificación y de la digestión. Cuando se amplificó con Bt1a y Bt1b se obtuvo solamente una respuesta a los primers que fue la muestra F39C1. Mientras que en la digestión con las ER se obtuvo solo fragmentos de ADN con *Alu* I (400-500 pb) y *Cfo* I (300-400 pb) para la muestra que amplificó con los primers. En tanto, *Hinf* I mostró el mismo tamaño (500-600 pb) (Figura 34).

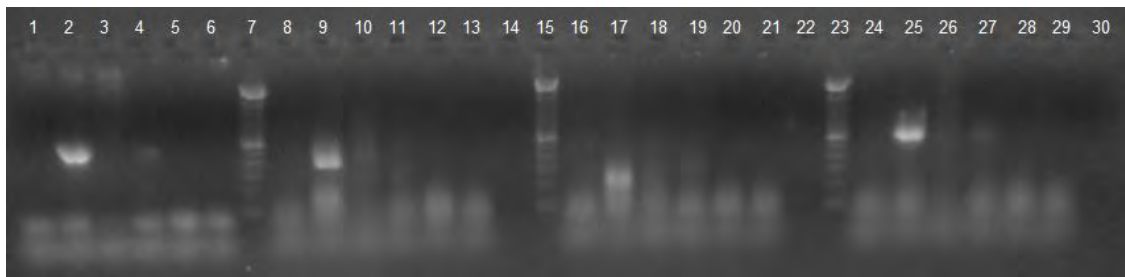


Figura 34: Productos de PCR del gen β -tubulina con primers Bt1a/Bt1b y productos de digestión. Referencias: 1 a 6, productos de PCR Bt1a/Bt1b: aislamientos F*01C3b, F39C1y F20C4, dos cepas América de *Verticillium dahliae*, control negativo de reacción, respectivamente; 8 a 14 digestión con *Alu* I, 16 a 22 digestión con *Cfo* I, 24 a 30 digestión con *Hinf* I: aislamientos F*01C3b, F39C1y F20C4, dos cepas América de *V. dahliae*, control negativo de PCR ITS1/ITS4, control negativo de digestión respectivamente; 7, 15 y 23, marcador 100 bp.

4.2.2.5 Digestión con la enzima *Hae* III para el mtDNA

En la digestión del mtDNA del ADN total no se obtuvo banda en ninguna muestra como se observa en la figura 35.

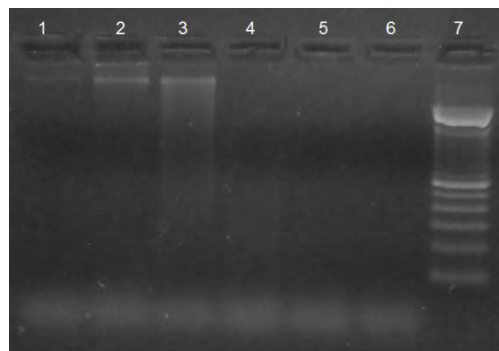


Figura 35: Productos de la digestión de mtDNA con *Hae* III. Referencias: 1, aislamiento F*01C3b; 2, aislamiento F39C1; aislamiento F20C4; 4 y 5, cepas América de *Verticillium dahliae*; 6 control negativo de reacción; 7, marcador 100 bp.

4.2.2.6 Análisis Multivariado

El análisis multivariado de los resultados de las pruebas de digestión con las enzimas de restricción *Hae* III e *Hinf* I (sobre productos de PCR con primers ITS1/ITS4), *Alu* I, *Gfo* I e *Hinf* I (sobre productos de PCR con primers Bt1a y Bt1b para detectar el gen de β -tubulina) se muestra en la figura 36. Se observa que los aislamientos América y América GC de *V. dahliae* se agrupan en un mismo grupo, mientras que los aislamientos que se presumen del género *Musciillium* se reúnen en otro conglomerado. Dentro de este último, dos aislamientos (F39C1 y F*01C3b) muestran un grado de asociación mayor respecto del tercer aislamiento F20C4. Con los doce resultados analizados para cada aislamiento el análisis arrojó un coeficiente de correlación cofenética satisfactorio (0.97).

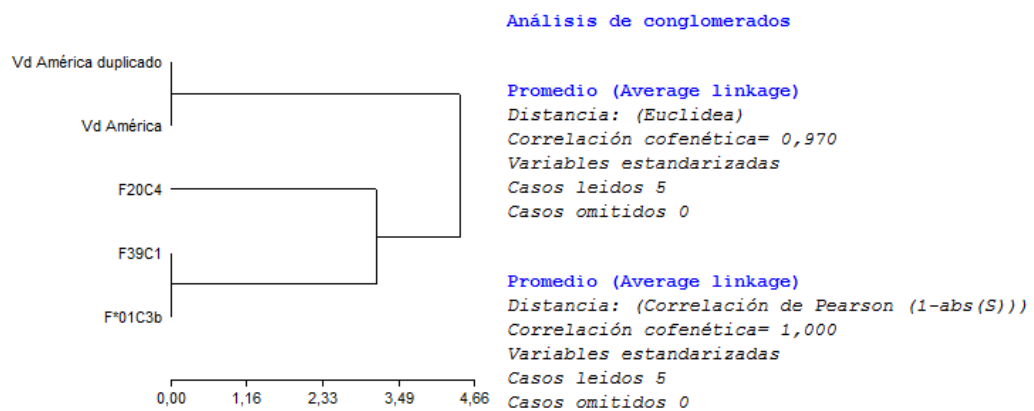


Figura 36: Dendrograma de clasificación de los aislamientos según los resultados de la digestión con las ER *Hae* III e *Hinf* I sobre productos de PCR ITS 1/ITS 4 y de las enzimas *Alu* I, *Cfo* I e *Hinf* I sobre PCR para β -tubulina. (Total de variable en el análisis multivariado: 12).

5. DISCUSIÓN

La superficie de producción de banana, según datos aportado por los productores, ronda actualmente las 2500 ha en total entre las provincias de Salta y Jujuy, cifra inferior a lo reportado por Colamarino (2010). Teniendo en cuenta este dato, el volumen de producción aportado por esta región al Mercado Central de Buenos Aires (MCBA) sería inferior al total mencionado en la Gacetilla de Frutas y Hortalizas del convenio INTA-CMCBA (2012).

Los resultado de incidencia y prevalencia de punta de cigarro son los primeros datos registrados para esta región y el país. Si bien son bajos, queda claro que de acuerdo a la información recabada en este trabajo y por los productores, la enfermedad se encuentra concentrada en pequeños sectores donde se la encontró, por lo tanto, permanece como una enfermedad cuarentenaria tipo A2 según Resol. ex SAGyP 99/94 de SENASA. Punta de cigarro fue mencionada por Carrera (1972) para la localidad de Orán en la provincia de Salta y esta tesis demuestra que no se ha expandido a toda la región. Es importante entonces evitar el ingreso de frutas provenientes de países limítrofes como Brasil, donde está presente (Cordeiro Maciel, 2000).

Por otra parte *M. theobromae*, uno de los agentes causales de punta de cigarro, fue descrito en nuestro país, sobre otra especie vegetal, la palmera *Euterpe edulis* (Capdet y Romero, 2010), donde podría permanecer aún sin causar daños. Si bien estos autores no asocian la presencia de este hongo a una enfermedad de la palmera, esta podría ser un reservorio o fuente de inóculo de *M. theobromae* en la naturaleza.

Las frutas recolectadas con síntomas de punta de cigarro se encontraron en distintos estados fenológicos, tanto en frutos de treinta a cuarenta días de desarrollo, que no fueron desflorados como menciona Soto Ballester (2008), como así también en frutos próximos a maduración y en poscosecha (Mendoza Padilla y Beltré Mercedes, 2000). Con lo cual, la enfermedad puede encontrarse y ocasionar daños, tanto en el campo como después de la cosecha.

Con las pruebas de patogenicidad se determinó que los aislamientos F*01C3b, F39C1 y F20C4 caracterizados por morfología como *M. theobromae* reprodujeron los síntomas característicos de la enfermedad. Resultados similares a los reportados por Massudi y Bonjar (2012), mientras que los aislamientos del género *Fusarium* encontrados en las frutas no reprodujeron los síntomas característicos de la punta de cigarro (Meredith, 1965). *Fusarium* es un género fúngico considerado como un agente secundario a la infección. Se descarta entonces, que la enfermedad en esta región sea

producida por la asociación entre *M. theobromae*, *Fusarium* spp. y *D. torulosa* (Góngora Benítez, 1999; Herrera Dávila, 2005; Lardizabal, 2007); ni entre la asociación de *M. theobromae* con *D. torulosa* (Meredith, 1961). Cabe resaltar que en este trabajo no se determinó ni *D. torulosa* ni *T. fructigena*.

Masudi y Bonjar (2012) demostraron que los síntomas se produjeron en las metodologías de inoculación 1a, 2a y 3a (herida más algodón estéril húmedo, herida más alta humedad e inoculación sin herida más alta humedad relativa, respectivamente), contrariamente a los resultados obtenidos en nuestro ensayo de patogenicidad. La metodología de inoculación que produjo los síntomas fue la 2b (herida y sin alta humedad relativa). Este resultado coincide con datos aportados por los productores de la zona, quienes sostienen que la mayor ocurrencia de la enfermedad (que ellos denominan “cigarreada”) se produce en la época cuando coinciden el inicio del aumento de las temperaturas y bajas humedades relativas (agosto a noviembre; Figura 1 y 2 del Anexo III). Son condiciones ambientales que no se corresponden con las citadas por Grajeda (2001); Ploetz (2003); Herrera Dávila (2005); Mouliom Pefoura *et al.* (2007) y Snowden (2010). Estudios epidemiológicos complementarios, que exceden los objetivos de esta tesis, son necesarios para determinar la fuente de inóculo, las condiciones agrometeorológicas que favorecerían el desarrollo del patógeno y el riesgo para el desarrollo de epifitias en esta región.

Siguiendo las características macro y micromorfológicas de los *Fusarium* descritas por Booth (1971, 1977) y Leslie y Summerel (2006), fueron identificadas algunas especies pertenecientes a este género, como *F. semitectum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*. Teniendo en cuenta que ningún *Fusarium* probado resultó patógeno, debido a la variabilidad que presentaron las medidas de las estructuras fúngicas (macro y microconidios, macro y microconidióforos), no se identificó la especie de los aislamientos restantes por el trabajo extra que hubiese demandado. Sin embargo, *Fusarium* ha sido asociado también a la podredumbre de la corona de los frutos en Argentina (Castelló *et al.*, 1986) y en Costa Rica (Vintimilla y Ávila Segura, 2001). Los aislamientos obtenidos podrían ser asociados a esta otra enfermedad de los frutos.

El color gris-marrón del centro de las colonias, las fiálides, los microconidios y microesclerocios de los aislamientos de *M. theobromae* (F*01C3b, F39C1 y F20C4) son características macro y micromorfológicas que se corresponden con las descripciones mencionadas por Zare (2003); Zare *et al.* (2007) y Masudi y Bonjar (2012) aún cuando la caracterización se realizó sobre APD + cloranfenicol. Además se midió solamente el largo de los conidios dado que la imagen en el microscopio no era

lo suficientemente neta, por lo que se obvió la medición del ancho. Teniendo en cuenta que las demás características coincidían con las descritas para *M. theobromae* y que se procedería a la confirmación por técnicas moleculares es que se decidió no completar esta variable.

El método de extracción de ADN utilizado por Clemente *et al.* (2017) para estudios de *V. dahliae* fue válido para extraer ADN de aislamientos de este trabajo, se obtuvo ADN de calidad para la identificación molecular. El ADN de los aislamientos F*01C3b y F39C1 no amplificó los segmentos específicos para *V. dahliae* demostrando así que no pertenecen a esta especie caracterizada por Clemente *et al.* (2017) en girasol. El aislamiento F20C4 mostró amplificación con los primers para *V. dahliae*, resultado discordante con la identificación por morfología que establecía su pertenencia a la especie *M. theobromae*.

Los primers ITS1 (Gardes y Burns, 1993) e ITS4 (White *et al.*, 1990) amplificaron la región ITS y se obtuvieron luego mediante digestión con las ER bandas de ADN de similares tamaños (*Hinf* I: 300 pb; *Hae* III: 400, 100 y 90 pb) que las obtenidas por Zare (2003) en su trabajo para identificar a *V. theobromae*, renombrado como *M. theobromae* por Zare *et al.* (2007). El aislamiento F20C4 amplificó tanto con los primers específicos para *V. dahliae* como con los ITS1/ITS4, pero en la digestión con las ER las bandas de ADN no coincidían en tamaño con las de las cepas de *V. dahliae* utilizadas como controles. Este hallazgo no puede ser dilucidado con las herramientas moleculares utilizadas en este trabajo, pero queda establecido que este aislamiento representaría una variante dentro del grupo analizado.

En la detección del gen β -tubulina con los primers Bt1a y Bt1b (Glass y Donaldson, 1995) se obtuvo amplificación para el aislamiento F39C1, no así para los otros dos, F*01C3b y F20C4. Resultado que se correlaciona en la digestión con ER, ya que solo el aislamiento F39C1 coincide en su patrón de restricción con lo informado por Zare (2003) al identificar a *V. theobromae* (*Alu* I: 380, 120 y 80 pb; *Cfo* I: 220, 195 y 130 pb; *Hinf* I: 510 pb). Si bien los aislamientos F*01C3b y F20C4 reprodujeron los síntomas de la enfermedad en las inoculaciones, los resultados de la caracterización molecular no fueron los esperados para corroborar la especie como agente causal de la enfermedad. Sería necesario reiterar las pruebas realizadas para confirmar estos resultados.

En el análisis del mDNA, Zare (2003) mostró patrones de bandas de ADN de la digestión con las ER. Estos resultados no coinciden con los obtenidos en este estudio de los aislamientos F39C1, F*01C3b y F20C4, ya que no se logró ninguna digestión

con las ER. Para que estos resultados sean fehacientemente comprobados se deberá repetir estas determinaciones.

Los resultados del análisis multivariado (Di Rienzo *et al.*, 2010) permitieron diferenciar mediante el dendrograma los grupos de las cepas de *V. dahliae* de los aislamientos caracterizados como *M. theobromae*. Con el conjunto de datos de los experimentos realizados con las ER para la región ITS1/ITS4 y para el gen β -tubulina se pudo evaluar las reacciones entre los aislamientos. Conformando grupos separados de *V. dahliae* de los aislamientos F39C1 y F*01C3b que presentaron un grado mayor de asociación respecto de F20C4, caracterizados los tres aislamientos por morfología como *M. theobromae*. Los aislamientos F39C1 y F*01C3b fueron obtenidos a partir de frutos con síntomas, recolectados en la provincia de Salta, mientras que F20C4 proviene de Jujuy, información que muestra la distribución de la enfermedad punta de cigarro. Aislamientos de *M. theobromae* determinados por técnicas clásicas de morfología, fueron luego diferenciados por pruebas moleculares. Esto sería indicativo de variabilidad en las poblaciones del patógeno en la zona bananera de nuestro país en las provincias de Santa y Jujuy. Como la prevalencia de punta de cigarrón fue baja, un limitado número de aislamientos fue obtenido, pero estos fueron suficientes para detectar esa variabilidad.

6. CONCLUSIONES

El método de muestreo utilizado para el relevamiento de punta de cigarro permitió evaluar una amplia área de cultivo (363 ha) y poder detectar bajos porcentajes de prevalencia (15 % para Jujuy y Salta) e incidencia de la enfermedad (entre 0,02 % y 0,36 %). Además se actualizó la superficie de producción del cultivo de banana para ambas provincias, la cual es considerablemente menor a la informada por los entes oficiales.

Por patogenicidad se determinó que la enfermedad punta de cigarro, presente en las provincias de Jujuy y Salta, es causada por un solo agente fúngico, que fue identificado como *M. theobromae* por caracterización macro y micromorfológica.

Los aislamientos identificados como *Fusarium*, *Collectotrichum* y *Alternaria* obtenidos de frutos con punta de cigarro, no resultaron patógenos, por lo que se considera que no son agentes causales de la enfermedad en Jujuy y Salta.

La especie fúngica *M. theobromae* a la que pertenecen los aislamientos patógenos F*01C3b, F39C1 y F20C4, caracterizados por morfología, fue confirmada a través de la digestión de la región ITS1 e ITS4 con enzimas de restricción (*Hae* III e *Hinf* I). En la digestión del gen β -tubulina con enzimas de restricción *Alu* I, *Cfo* I y *Hinf* I, solo F39C1 se caracterizó como *M. theobromae*.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten aceptar la hipótesis planteada y afirmar que *M. theobromae* es el agente causal de la enfermedad de la banana denominada punta de cigarro en las provincias de Salta y Jujuy.

Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda a las autoridades correspondientes que se plantee un plan de trabajo para controlar y/o erradicar esta enfermedad. Punta de cigarro no es considerada una enfermedad clave para la producción de banana, pero no se cuenta con información suficiente para afrontarla ante la aparición de un epifitio.

Además, si bien existe una resolución (Resolución 99/94 SAGyP) que prohíbe el ingreso al noroeste Argentino, de frutas de banana importadas, es importante se controlen las fronteras agropecuarias para evitar el ingreso de otras enfermedades como Sigatoka negra producida por *Mycosphaerella fijensis* y mancha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), ya que es conocido el grado de daños que producen en otros países.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. N. 1991. Plant Pathology. 5ta Ed. Elsevier Academic Press Publications, California. 753 p.
- AUBERT, B. 1973. Particularités anatomiques liées au comportement hydrique des bananiers. *Fruits*. 28(9):589-604.
- ARROYO, A.; RODRIGUEZ, M. 2005. Situación del cultivo de banana en la región subtropical de Salta-Jujuy. Estación Experimental de Cultivos Tropical Yuto (EECT), Agencia de Extensión Rural Orán, Argentina. Informe técnico. 5 p.
- BAKER, R.; CAFFIER, D.; WILLIAM CHOISEUL, J.; DE CLERCQ, P.; DORMANN SNE, S. E.; GEROWITT, B.;; VLOUTOGLOU, I. 2008. Pest risk assessment made by France on *Trachysphaera fructigena* considered by France as harmful in French overseas departments of French Guiana, Guadeloupe, Martinique and Réunion. *EFSA Journal*. 664:1-23.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 1998. Illustrated genera of fungus imperfect. 4ta Ed. APS Press, St. Paul, Minnesota. 218 p.
- BERARDI, A. 1960. El cultivo del banano en la República Argentina. Colección Agropecuaria del INTA. Buenos Aires, Argentina. 147 p.
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Agriculture Bureaux. England. 237 p.
- BOOTH, C. 1977. *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute, Ferry, Surrey, England. 58 p.
- BORGES, A.; SOUZA, L. 2004. O cultivo da bananeira. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Ministerio de Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Cruz das Almas – BA. 279 p.
- CABALLERO HERNANDEZ, A.J., 2011. Uso de hongos endófitos de *Trichoderma* spp., para el biocontrol del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) raza tropical 1 en vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA). Tesis M.S. Centro Agronómico tropical de investigación y enseñanza escuela de posgrado. Turrialba, Costa Rica. 90 p.
- CAPDET, M. y ROMERO, A. 2010. Fungy from palms in Argentina. 1. *Mycotaxon* 112: 339-355.
- CARRERA, C. J. M. 1972. *Musa* sp. *Stachylidium theobromae* Turconi. Ficha fitopatológica N° 001643. INTA IMYZA Castelar, Buenos Aires. [En línea] <<http://www.fitopatlas.org.ar/inicio.aspx#/Hospedante?Id=2113>> [consulta: 12 de junio de 2014]
- CASTELLÓ, W.J.; VECCHIETTI, N.B.; ZAPATA, S.R., 1986. Podredumbre de la corona del banano. 6° Jornadas Fitosanitarias Argentinas. [En línea] <<http://rian.inta.gov.ar/atlas/Inicio.aspx#/ConsultaGeneral?Id=2113>> [consulta: 15 de septiembre de 2017]

- CHAMPION, J. 1963. Le Bananier. In Maisonneuve. Larose. Paris, FR. 263 p.
- CHAMPION, J. 1968. El plátano. Blume. Barcelona, España. 247 p.
- CHARPENTIER, J.M. 1966. La remontée du meristeme central du bananier. Fruits. 21(3):103-119.
- CLEMENTE, G.E., BAZZALO, M.E., ESCANDE, A.R. 2017. New variants of *Verticillium dahliae* causing sunflower leaf mottle and wilt in Argentina. Journal of Plant Pathology. 99(2):445-451.
- COLAMARINO, I. 2010. Producción de bananas. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca. Buenos Aires, Argentina. Alimentos Argentinos, Informe sectorial N° 3. 40 p.
- COMERCIALIZACIÓN DE BANANAS EN EL MERCADO CENTRAL DE BUENOS AIRES. AÑO 2002-2011. 2012. Gacetilla de frutas y hortalizas del convenio inta-cmcba n°18, 2012. [En línea] <<http://www.mercadocentral.gob.ar/gacetilla.php>> [consulta: 19 de junio de 2015]
- CORDEIRO MACIEL, Z.J., 2000. Banana Fitosanidade. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Ministerio de Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Embrapa Comunicação para Transferencia de Tecnologia. Brasília-DF. 121 p.
- DE LANGHE, E. 1961. La phyllotaxie du bananier et ses consequences pour le compréhension du systeme rejetonnant. Fruits. 16(9):429-441.
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. 2010. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 336 p.
- FAO. 2004. La economía mundial del banano 1985-2002. P. Arias; C. Dankers; P. Liu; P. Pilkauskas. eds. Servicio de Materias Primas, Productos Tropicales y Hortícolas. Dirección de Productos Básicos y Comercio. Roma. 95 p.
- FAOSTAT. División de Estadística. 2011. [En línea] <<http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>> [consulta: 16 de marzo 2016]
- FAOSTAT (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. División de Estadística), 2012. [En línea] <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>> [consulta: 18 de junio 2014]
- FAO. 2014. Banana Market Review and Banana Statistics 2012-2013. Intergovernmental Group on Banana and Tropical Fruits. 34 p. [En línea] <<http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>> [consulta: 14 de junio de 2014]
- FAOSTAT. División de Estadística, 2015. [En línea] <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>> [consulta: 05 de marzo de 2016]
- FAOSTAT. División de Estadística, 2016. [En línea] <<http://faostat3.fao.org/browse/T/TP/E>> [consulta: 16 de marzo de 2016]

- FILHO, A.B.; KIMATI, H.; AMORIN, L. 1995. Manual de Fitopatologia. v 1: Principios e Conceitos. 3º ed. Departamento de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Univerdiade de São Paulo. CERES. São Paulo, Brasil. pp.647-671.
- FISHER, N.L.; BURGESS, L.W.; TOUSSOUN, T.A.; NELSON, P.E., 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*. 72:151-153.
- GARDES, N.L.; BRUNS, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2:113-118.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. 1995. Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appied and Environmental Microbiolgy*. 61:1323-1330.
- GONGORA BENITEZ, J.E. 1999. Caracterización del subsistema plátano (*Musa paradisiaca* L) en los sistemas de producción de los municipios de Tiquisate y Nueva Concepción en el departamento de Escuintla. Tesis Ingeniero Agrónomo con el grado de Licenciado. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 19 p.
- GOUJON, M. M. 1965. Étude expérimentale du développement du thalle du *Trachysphaera fructigena* Tab. et Bunt. Extrait de la revue générale de botanique. 72:353.
- GRAJEDA, D. 2001. El plátano: información técnica del plátano. Guatemala. 38 p.
- HAWKSWORTH, D.L.; HOLLIDAY, P. 1970. *Verticillium theobormae*. CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. 259 p.
- HEIT, G. 2009. Banano. SINAVIMO. Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. Buenos Aires, Argentina. 5 p.
- HERRERA DAVILA, M.V. 2005. Evaluación de dos alternativa agroclturales y dos productos químicos, para reducir las pérdidas provocadas por los hongos (*Verticillium theobromae* (Turconi) Tesis de Grado. Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 46 p.
- IPGRI-INIBAP/CIRAD. 1996. Descriptores para el banano (*Musa* spp.). Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos, Roma, Italia; Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia; y el Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Montpellier, Francia. International Plant Genetic Resources Institute. 57 p.
- JONES, D. 2000. Diseases of banana, abacá and enset. New York, US, CABI. 925 p.
- KOVELIS, V.N.; ZARE, R.; BRIDGE, P.D.; TAYPAS, M.A. 1999. Differntiation of mitochondrial subgroups in the *Verticillium lecanii* species complex. *Letters in Applied Microbiology*. 28:263-268.
- LARA, E.F. 1970. Problemas y procedimientos bananeros en la zona Atlántica de Costa Rica. Trejos. San José. Costa Rica. 278 p.

- LARDIZABAL, R. 2007. Producción de plátano de alta densidad. Manual de Producción. Entrenamiento y desarrollo de agricultores. MCA-Honduras / EDA. Honduras. 31 p.
- LASSOUDIÈRE, A. 1971. La croissance des racines du bananier. *Fruits*. 26(7-8):501-512.
- LASSOUDIÈRE, A. 1978c. Quelques aspects de la croissance et du développement du bananier "Poyo" en Cote d'Ivoire. III. Le faux-tronc et le système foliaire. *Fruits*. 33(6):373-412.
- LASSOUDIÈRE, A. 1978d. Quelques aspects de la croissance et du développement du bananier "Poyo" en Cote d'Ivoire. IV. L'inflorescence. *Fruits*. 33(7-8):457-491.
- LASSOUDIÈRE, A. 1978e. Quelques aspects de la croissance et du développement du bananier "Poyo" en Cote d'Ivoire. V. Conclusions générales et applications aux techniques culturales. *Fruits*. 33(7-8):492-503.
- LASSOUDIÈRE, A. 1979a. Comportement du bananier Poyo au second cycle. I. Rejetonnage et multiplication végétative. *Fruits*. 34(11):645-658.
- LASSOUDIÈRE, A. 1979b. Comportement du bananier Poyo au second cycle. II. Aspects généraux. *Fruits*. 34(12):713-718.
- LASSOUDIÈRE, A. 1980a. Comportement du bananier Poyo au second cycle. III. Etude d'une population. *Fruits*. 35(1):3-17.
- LASSOUDIÈRE, A. 1980b. Comportement du bananier Poyo au second cycle. IV. Mise en évidence d'interactions entre rejet et pied mère et entre rejet frères. *Fruits*. 35(2):69-93.
- LEIVA MORA, M.; ALVARADO CAPÓ, Y.; ACOSTA SUAREZ, M.; CRUZ MARTIN, M.; ROQUE, B.; CARRERA, C. 2013. *Deightoniellas torulosa* (Syd.) M.B. Ellis, causing leaf spot in acclimatized *Grande naine* (*Musa*, AAA) plants. Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. 28(2):145-148.
- LEON, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. IICA. San José, Costa Rica. 445 p.
- LEON AGATON, L.; MEJIA GUTIERREZ, L.F. 2002. Determinación del tiempo de crecimiento para cosecha y comportamiento fisiológico poscosecha del banano variedad Gros Michael. Tesis: Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Manizales. 48 p.
- LESLIE, J.F.; SUMMEREL, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. USA. 388 p.
- MAINA, G. J.; OTIPA, M.; ORONJE, M. L.; NJOROGE, C. 2013. Pest management decision guide: Green and yellow list. Cigar end rot on banana. *Verticillium theobromae* and *Trachysphaera fructigena*. Plantwise, CABI. Kenia. [En línea] <www.plantwise.org> [consulta: 03 de abril de 2017]
- MALLESSARD, R. 1966. Etude de la mycoflore des racines du bananier "poyo". *Fruits*. 21(10):543-552.

- MASUDI, S.; BONJAR, G.H.S. 2012. Fulfillment of Koch's postulates for in vitro pathogenicity of *Musicillium theobromae* (Turconi) Zare & W. Gams as the cause of banana cigar end rot disease. *Journal of Plant Protection Research*. 52(4):410-414.
- MATUTE VARGAS, A.; GUILLEN, J. 1992. Manual de producción de plátano. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola A Lima, Cortes, Honduras,. 109 p.
- MAY, S.; PLAZA, G. 1958. La United Fruit Co en América Latina. USA National Planning Association. 291 p. [En línea] <<https://www.questia.com/read/24631254/the-united-fruit-company-in-latin-america>> [consulta: 29 de marzo de 2016]
- MAZACOTTE, V.; SCRIBANO, F.; CARDOZO, F. 2011. Estudio sobre antecedentes históricos y situación actual del cultivo de banana (*Musa paradisiaca*) en la provincia de Formosa, Argentina. Congreso Internacional del cultivo de banano. IPAF NEA. pp.29.
- MENDOZA PADILLA, I.; BELTRE MERCEDES, J.E. 2000. Alternativas sostenibles en el control de infecciones postcosecha del plátano (*Musa* AAB, ABB). Tesis de Ingeniero Agrónomo con grado de Licenciatura. Universidad EARTH. Guácimo, Costa Rica. 77 p.
- MEREDITH, D.S. 1961. *Deightoniella torulosa* (Syd.) Ellis and *Verticillium theobromae* (Turc.) Mason & Hughes associated with a tip-rot of banana fruits. Banana Board Research, Kingston, Jamaica, W.I. *Transaction of the British Mycological Society*. 44(4):487-492.
- MEREDITH, D.S. 1965. Tip rot of banana fruits in Jamaica. II. *Verticillium theobromae* and *Fusarium* spp. Banana Board Research, Kingston, Jamaica, W.I. *Transaction of the British Mycological Society*. 48(2):327-336.
- MINISTERIO de la AGRICULTURA, 2012. Instructivo técnico del cultivo del plátano. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Cuba. 14 p.
- MOLINA, N.A.; SCRIBANO, F.; TENAGLIA, G.; RODRIGUEZ, D. 2015. Costo de Producción de Banana en Formosa. EEA INTA Bella Vista. Serie técnica N° 50. 14 p.
- MORENO MENA, J.M.; BLANCO URINA, C.; MEONDOZA TORRES, R.J. 2009. Buenas prácticas agrícolas en el cultivo del banano en la región del Magdalena. Reducción del escurrimiento de plaguicidas al Mar Caribe. Comunicaciones Augura. Medellín, Colombia. 52 p.
- MOULIOM PEFOURA, A.; KENNANG OUAMB, A. J.; NKENFOU, C.; NGUIDJO, O.; DONGMO, R. 2007. Influence of the temperature on radial growth sporulation of *Trachysphaera fructigena*, causal agent of the *Musa* cigar end rot disease. *African Crop Science Conference Proceedings*. 8:849-852.
- NELSON, S.C.; PLOETZ, R.C.; KEPLER, A.K. 2006. *Musa* species (banana and plantain). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. [En línea] <www.traditionaltree.org> [consulta: 05 de Agosto de 2014]
- ORTIZ, R.A.; LOPEZ, A.; PONCHNER, S.; SEGURA, A. 2001. El cultivo del Banano. EUNED. San José, Costa Rica. 186 p.

- PALENCIA, G.; GOMEZ SANTOS, R.; MARTIN, J. 2006. Manejo sostenible del cultivo del planto. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Bucaramanga. Colombia. 27 p.
- PERERA GONZALES, S.; MOLINA LEON, M. J. 2002. Plagas y enfermedades de la platanera en Canarias y su control integrado. Santa Cruz de Tenerife: Cooperativa Platanera de Canarias. España. 63 p.
- PLOETZ, R.C. 2003. Diseases of Tropical Fruit Crops. University of Florida, IFAS, Tropical Research and Education Center Homestead, Florida, USA. 99-134 p. [En línea] <https://books.google.com.ar/books?id=tgl_tu6rpgC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false> [consulta: 14 de noviembre de 2016]
- RAM, H.Y.M.; RAM, M.; STEWARD, F.C. 1962. Growth and development of the banana plant. 3.A. The origin of the inflorescence and the development of the flowers. 3.B. The structure and development of the fruit. Annals of Botany N.S. 26(104):657-671.
- RIOS, D.; MONTOYA PEREZ, G.N. 2012. Manual para el cultivo de banano en la zona cafetera. Universidad Católica de Oriente; AFER. Natural Control; Corpoagro; Biorgánicos; Rionegro, Antioquia. Colombia. 24 p.
- ROBINSON, J.; SAUCO, V. 2011. Plátanos y Bananas. Mundi-Prensa. Madrid, España. 336p.
- ROMAN, A.J.G. 2012. Respuesta espacial de la productividad al nivel freático de la finca El Paso en el cultivo de Banano (*Musa acuminata*), basado en el uso de sistema de información geográfica. Tesis de Maestría en Sistema de Información Geográfica. Universidad San Francisco de Quito. Colegio de Postgrado. Quito. 104 p.
- ROQUE VAQUERO, M. 2005. Soil physical properties and banana root growth. In: Turner, D.W. y Rosales, F.E. (eds.) Banana Root System: Towards a Better Understanding for its Productive Magnament. Proceedings of an International symposium in Costa Rica. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. pp.125-131.
- SIMMONDS, N.W.; SHEPHERD, K. 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. Journal of the Linnaean Society London, Botany 55:302-312p. [En línea] <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x/abstract>> [consulta: 28 de marzo de 2016]
- SIMMONDS, N.W. 1962. The evolution of the bananas. Longman, London, UK. 170 p.
- SIMMONDS, N.W. 1973. Los plátanos. Blume. Barcelona, España. 593 p.
- SINAVIMO – SENASA 2009. Banano. Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas – Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Argentina. 5 p.
- SNOWDEN, A. L. 2010. Post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. v. 1. General Introduction & Fruits. University of Cambridge. Manson Publishing Ltd. 108-109 p. [En línea] <https://books.google.com.ar/books?id=JLQiOK5t_sC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false> [consulta: 28 de marzo de 2016]

- SORENSEN, L.H.; SPARKS, W.C. 1980. A method for determining the bruise resistance of potatoes. *American Potato Journal*. 54:494.
- SOTO BALLESTERO, M. 1990. Bananos. Cultivos y comercialización. 2 ed. San José. Costa Rica. 627 p.
- SOTO BALLESTERO, M. 1994. El cultivo del Banano, Producción y Comercialización: Planteamiento de una empresa bananera, San José. Costa Rica. pp.165-172.
- SOTO BALLESTERO, M. 2000). Bananos - Técnicas de producción, manejo poscosecha y comercialización. San José, Costa Rica. Litografía e Imprenta LIL. pp.29-114.
- STOVER, R.H.; SIMMONDS, N.W. 1987. Bananas. 3 ed. Longmans Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK. 468 p.
- TAPIA, C.; FAGIANI, M. 2009. Estado actual de la producción de bananos subtropicales en el NOA Argentino. Simposio Internacional de Plátano y Banano, Santa Bárbara de Zulia – Venezuela. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago. Producción Agropecuaria. 2(1):19-26.
- TAPIA, S.; RIVADENEIRA, M.; GARCIA RODRIGUEZ, M.; RUEDA, E.; RUEDA, N.; BEJARANO, S.; OCHOA, S.; CARRIZO C. 2008. Plagas y enfermedades del banano. Instituto de Tecnología Nacional Agropecuaria, INTA, Buenos Aires, Argentina. 15 p.
- TABARES, G.; FALQUES, C. 1997. Contenido nutricional y absorción de nutrientes en plantas de banano (*Musa AAA*) Subgrupo Cavendish, clon “Gran Enano”, en diferentes etapas fenológicas de desarrollo. Proyecto de Graduación. EARTH. Guácimo, Costa Rica. 77 p.
- VINTIMILLA, M.A.; AVILA SEGRUA, L. M. 2001. Estudio del comportamiento del EM5 sobre los hongos *Colletotrichum* y *Fusarium*, causante de la pudrición de la corona en banano de la región Atlántica de Costa Rica. Tesis Ingeniero Agrónomo con el grado de Licenciatura. Guácimo, Costa Rica. Universidad EARTH. 79 p.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes from phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to methods and applications. M.A. Innes, D. H. Gelfand, J. S. Sninsky and T. J. White eds. Academic Press, London, UK. pp.315-322.
- ZARE, R. 2003. A revision of plant-associated *Verticillium* species. Department of Botany, Plant Pests & Diseases Research Institute. Rostaniha. 4:29-54.
- ZARE, R.; GAMS, W.; STARINK WILLEMSE, M.; SUMMERBELL, R. C. 2007. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia*. Stuttgart. 85:463-489.

8. APÉNDICE

ANEXO I

Resultados de la primera inoculación.

Análisis del Volumen basal necrosado por los aislamientos inoculados en frutas de banana.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol basal	360	0,09	0,04	745,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3624645,50	19	190770,82	1,73	0,0305
Colonia	3624645,50	19	190770,82	1,73	0,0305
Error	37569148,75	340	110497,50		
Total	41193794,25	359			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=217,94737

Error: 110497,4963 gl: 340

Colonia	Medias	n	E.E.	
F36C2	5,39	18	78,35	A
Testigo2	5,56	18	78,35	A
F24C1	6,82	18	78,35	A
Testigo	7,05	18	78,35	A
F35C2	7,20	18	78,35	A
F6C4	8,53	18	78,35	A
F12C2	8,55	18	78,35	A
F21C4	8,87	18	78,35	A
F4C2b	9,12	18	78,35	A
F2C1	9,53	18	78,35	A
F30C1	11,25	18	78,35	A
F6C6	13,64	18	78,35	A
F20C4	13,69	18	78,35	A
F25C3a	16,96	18	78,35	A
F24C2b	17,37	18	78,35	A
F19C4	17,66	18	78,35	A
F13C1	21,20	18	78,35	A
F16C4	31,86	18	78,35	A
F39C1	256,41	18	78,35	B
F*01C3b	414,57	18	78,35	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 1: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen basal necrosado de los aislamientos inoculados.

Vol basal 360 0,05 0,04 745,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2154451,19	5	430890,24	3,91	0,0018
Metodologías	2154451,19	5	430890,24	3,91	0,0018
Error	39039343,06	354	110280,63		
Total	41193794,25	359			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=119,24065

Error: 110280,6301 gl: 354

Metodologías	Medias	n	E.E.	
3a	0,00	60	42,87	A
3b	0,10	60	42,87	A
1a	12,29	60	42,87	A
1b	17,63	60	42,87	A
2a	20,71	60	42,87	A
2b	216,64	60	42,87	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 2: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen basal necrosado para cada una de las metodologías de inoculación indicadas previamente (en punto 4.1.2).

Análisis del Volumen apical necrosado por los aislamientos inoculados en frutas de banana.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol apical	360	0,17	0,12	121,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6267,04	19	329,84	3,57	<0,0001
Colonia	6267,04	19	329,84	3,57	<0,0001
Error	31378,06	340	92,29		
Total	37645,10	359			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=6,29867

Error: 92,2884 gl: 340

Colonia	Medias	n	E.E.	
F*01C3b	3,37	18	2,26	A
F4C2b	4,74	18	2,26	A B
F36C2	5,09	18	2,26	A B
F12C2	5,29	18	2,26	A B
F2C1	5,33	18	2,26	A B
F39C1	5,63	18	2,26	A B
F30C1	5,81	18	2,26	A B
Testigo2	5,90	18	2,26	A B
F21C4	6,68	18	2,26	A B
F6C4	6,82	18	2,26	A B
F25C3a	7,28	18	2,26	A B
F24C1	7,41	18	2,26	A B
F35C2	7,48	18	2,26	A B
F6C6	8,47	18	2,26	A B
F20C4	8,78	18	2,26	A B
Testigo	8,97	18	2,26	A B
F24C2b	9,68	18	2,26	B
F19C4	10,62	18	2,26	B
F13C1	10,68	18	2,26	B
F16C4	23,99	18	2,26	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 3: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen apical necrosado de los aislamientos inoculados.

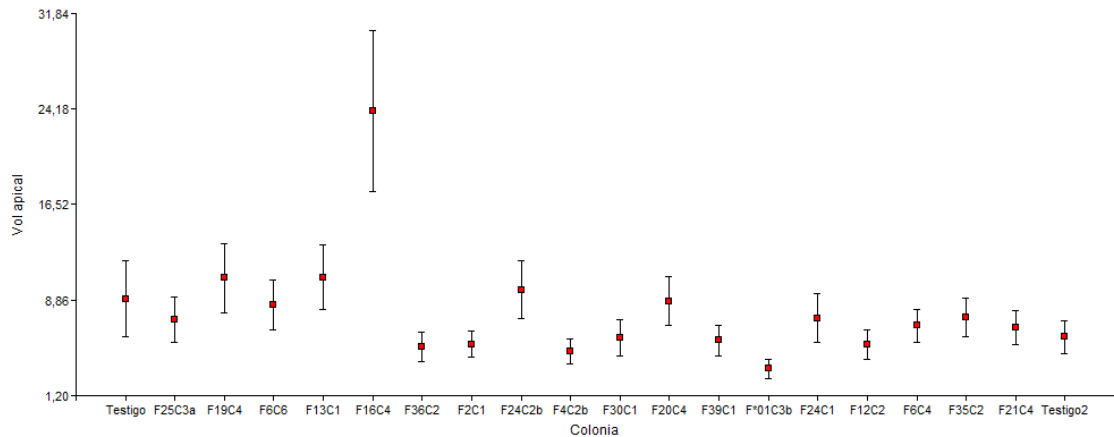


Figura 4: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen apical necrosado (mm^3) producido por los aislamientos: F25C3a, F19C4, F6C6, F13C1, F16C4, F36C2, F2C1, F24C2b, F4C2b, F30C1, F20C4, F39C1, F*01C3b, F24C1, F12C2, F6C4, F35C2, F21C4 y Testigo 1 y 2.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol apical	360	0,27	0,26	111,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10059,81	5	2011,96	25,82	<0,0001
Metodologías	10059,81	5	2011,96	25,82	<0,0001
Error	27585,29	354	77,92		
Total	37645,10	359			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,16965

Error: 77,9246 gl: 354

Metodologías	Medias	n	E.E.	
3b	0,52	60	1,14	A
3a	0,92	60	1,14	A
1a	8,49	60	1,14	B
2a	11,74	60	1,14	C
1b	12,62	60	1,14	C
2b	13,11	60	1,14	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 5: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen apical necrosado para cada una de las metodologías de inoculación indicadas previamente (en punto 4.1.2).

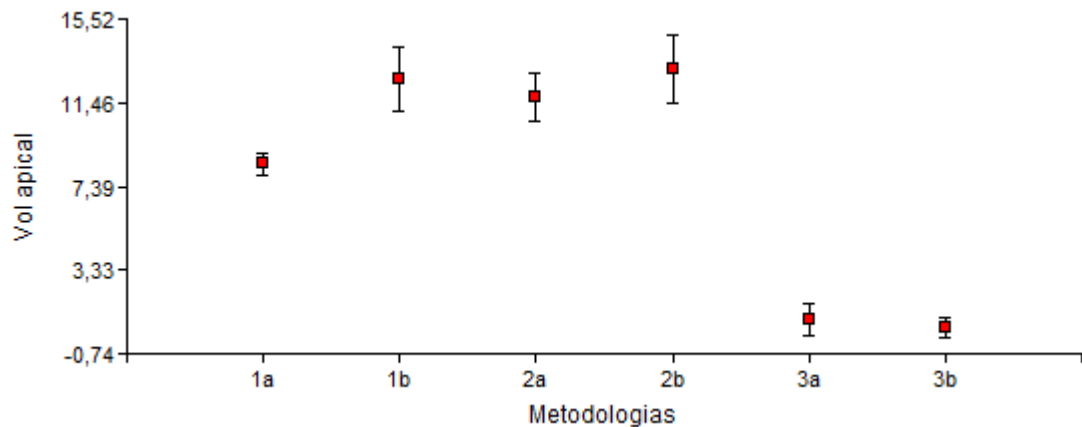


Figura 6: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen apical necrosado (mm^3) para las metodologías de inoculación: 1a) herida más algodón estéril húmedo, 1b) herida más algodón estéril seco, 2a) herida más alta humedad relativa, 2b) herida con baja humedad relativa, 3a) inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) inoculación sin herida con baja humedad relativa.

Resultados de la segunda inoculación.

Volumen basal necrosado

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol basal	198	0,09	0,04	548,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	538852,22	10	53885,22	1,76	0,0702
Aislamientos	538852,22	10	53885,22	1,76	0,0702
Error	5718504,18	187	30580,24		
Total	6257356,40	197			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=114,99183

Error: 30580,2363 gl: 187

Aislamientos	Medias	n	E.E.	
Testigo	0,28	18	41,22	A
F2C1	3,67	18	41,22	A
F20C4	3,79	18	41,22	A
F30C1	4,79	18	41,22	A
F16C4	8,78	18	41,22	A
F19C4	10,59	18	41,22	A
F13C1	11,62	18	41,22	A
F24C2b	12,98	18	41,22	A
F6C6	26,07	18	41,22	A
F*01C3b	89,40	18	41,22	A B
F39C1	178,59	18	41,22	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 7: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen basal necrosado de los aislamientos inoculados.

Vol basal 198 0,09 0,07 540,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	561344,61	5	112268,92	3,78	0,0027
Metodologías	561344,61	5	112268,92	3,78	0,0027
Error	5696011,79	192	29666,73		
Total	6257356,40	197			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=83,63480

Error: 29666,7281 gl: 192

Metodologías	Medias	n	E.E.	
3a	0,00	33	29,98	A
3b	0,00	33	29,98	A
1b	12,10	33	29,98	A
1a	14,13	33	29,98	A
2a	14,87	33	29,98	A
2b	150,13	33	29,98	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 8: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen basal necrosado para cada una de las metodologías de inoculación indicadas previamente (en punto 4.1.2).

Volumen necrosado de la parte apical de la fruta

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7747,51	10	774,75	4,48	<0,0001
Colonia	7747,51	10	774,75	4,48	<0,0001
Error	32349,45	187	172,99		
Total	40096,96	197			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=8,64887

Error: 172,9917 gl: 187

Colonia	Medias	n	E.E.	
F39C1	0,70	18	3,10	A
Testigo	1,60	18	3,10	A
F*01C3b	2,08	18	3,10	A
F20C4	2,25	18	3,10	A
F2C1	2,46	18	3,10	A
F24C2b	5,17	18	3,10	A B
F13C1	5,81	18	3,10	A B
F30C1	5,84	18	3,10	A B
F16C4	5,89	18	3,10	A B
F19C4	12,53	18	3,10	B
F6C6	23,26	18	3,10	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 9: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen apical necrosado de los asilamientos inoculados.

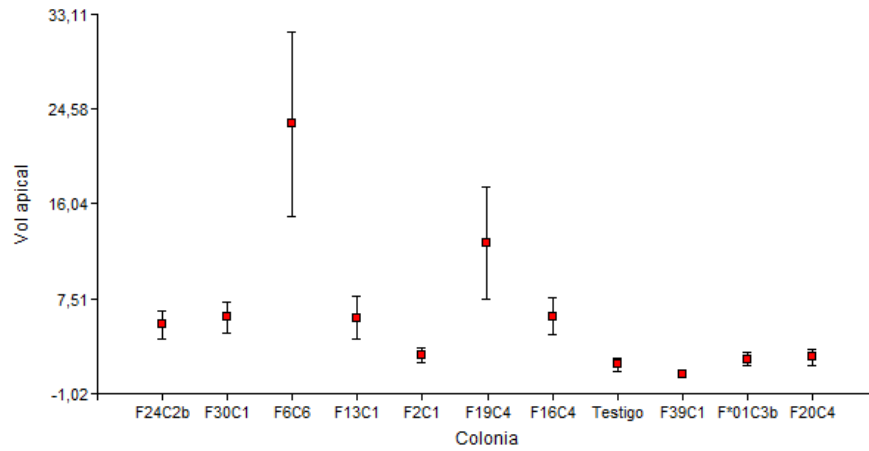


Figura 10: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen apical necrosado (mm^3) producido por los aislamientos inoculados: F24C2b, F30C1, F6C6, F13C1, F2C1, F19C4, F16C4, Testigo, F39C1, F*01C3b y F20C4.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol apical	198	0,15	0,12	217,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5852,44	5	1170,49	6,56	<0,0001
Metodologías	5852,44	5	1170,49	6,56	<0,0001
Error	34244,52	192	178,36		
Total	40096,96	197			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=6,48481

Error: 178,3569 gl: 192

Metodologías	Medias	n	E.E.
3a	0,00	33	2,32 A
3b	0,00	33	2,32 A
1b	4,23	33	2,32 A B
1a	6,94	33	2,32 B C
2b	10,88	33	2,32 C D
2a	14,81	33	2,32 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 11: Análisis de la varianza y comparación de medias para el volumen apical necrosado para cada una de las metodologías de inoculación indicada previamente (en punto 4.1.2).

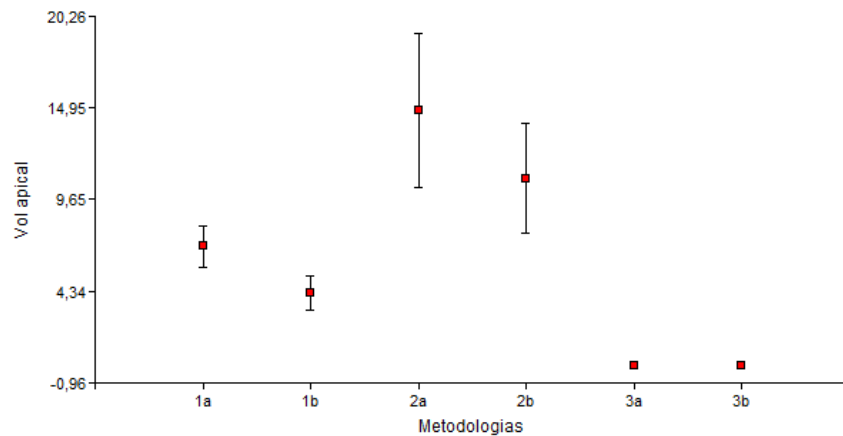


Figura 12: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen apical necrosado (mm^3) para las metodologías de inoculación: 1a) herida más algodón estéril húmedo, 1b) herida más algodón estéril seco, 2a) herida más alta humedad relativa, 2b) herida con baja humedad relativa, 3a) inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) inoculación sin herida con baja humedad relativa.

Resultado de la tercera inoculación producida en frutas sana de bananas, descrita en parte en el punto 4.1.2.

Volumen basal necrosado

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol Basal	198	0,06	4,8E-03	375,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8518,12	10	851,81	1,09	0,3683
Colonia	8518,12	10	851,81	1,09	0,3683
Error	145528,47	187	778,23		
Total	154046,60	197			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=18,34424

Error: 778,2271 gl: 187

Colonia Medias n E.E.

Colonia	Medias	n	E.E.	
F30C1	3,55	18	6,58	A
F24C2b	3,55	18	6,58	A
F2C1	3,81	18	6,58	A
F16C4	4,23	18	6,58	A
F13C1	4,23	18	6,58	A
Testigo	4,74	18	6,58	A
F19C4	6,34	18	6,58	A
F6C6	6,88	18	6,58	A
F39C1	8,12	18	6,58	A
F*01C3b	8,81	18	6,58	A
F20C4	27,39	18	6,58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 13: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen basal necrosado de los asilamientos inoculados.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol Basal	198	0,07	0,04	368,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10018,36	5	2003,67	2,67	0,0233
Metodologías	10018,36	5	2003,67	2,67	0,0233
Error	144028,23	192	750,15		
Total	154046,60	197			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=13,29920

Error: 750,1470 gl: 192

Metodologías	Medias	n	E.E.
3a	0,00	33	4,77 A
3b	0,00	33	4,77 A
1b	6,20	33	4,77 A
1a	6,99	33	4,77 A
2b	10,41	33	4,77 A B
2a	20,94	33	4,77 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 14: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen basal necrosado para cada una de las metodologías de inoculación.

Volumen necrosado de la parte apical de la fruta

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol Apical	198	0,07	0,02	144,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	632,02	10	63,20	1,46	0,1579
Colonia	632,02	10	63,20	1,46	0,1579
Error	8102,40	187	43,33		
Total	8734,43	197			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,32845

Error: 43,3284 gl: 187

Colonia	Medias	n	E.E.
Testigo	2,13	18	1,55 A
F30C1	2,70	18	1,55 A B
F13C1	3,23	18	1,55 A B
F24C2b	3,36	18	1,55 A B
F2C1	3,93	18	1,55 A B C
F20C4	3,99	18	1,55 A B C
F39C1	4,42	18	1,55 A B C
F*01C3b	4,74	18	1,55 A B C
F6C6	6,55	18	1,55 B C
F19C4	6,90	18	1,55 B C
F16C4	8,07	18	1,55 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 15: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen apical necrosado de los aislamientos inoculados.

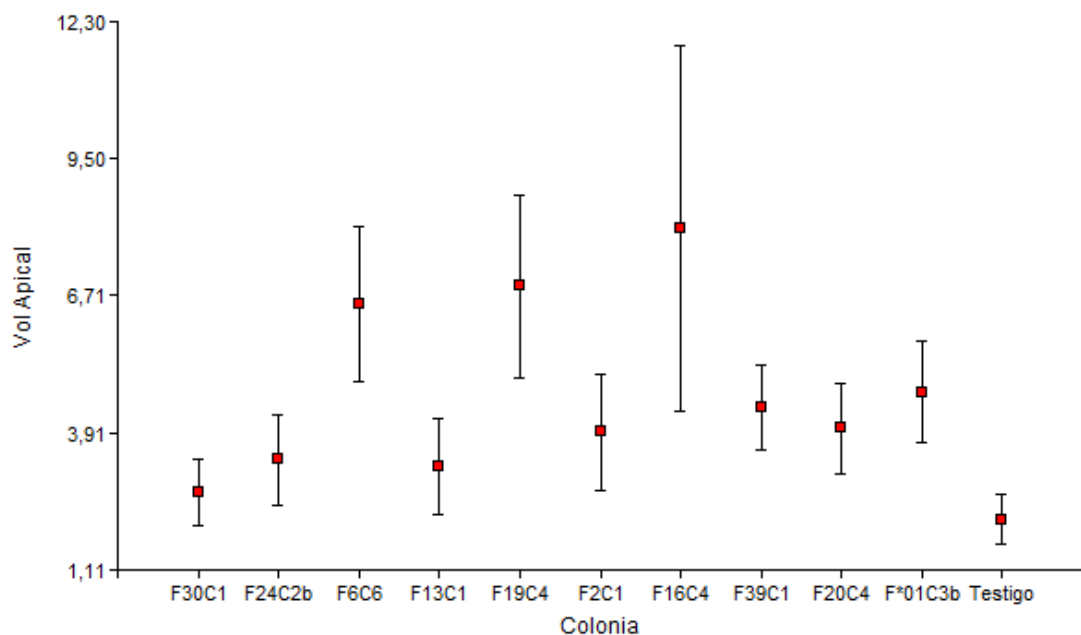


Figura 16: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen apical necrosado (mm^3) producida por los aislamientos inoculados: F30C1, F24C2b, F6C6, F13C1, F19C4, F2C1, F16C4, F39C1, F20C4, F*01C3b y Testigo.

Vol Apical 198 0,26 0,24 127,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2250,66	5	450,13	13,33	<0,0001
Metodologías	2250,66	5	450,13	13,33	<0,0001
Error	6483,77	192	33,77		
Total	8734,43	197			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,82173

Error: 33,7696 gl: 192

Metodologías	Medias	n	E.E.	
3a	0,00	33	1,01	A
3b	0,00	33	1,01	A
1a	5,68	33	1,01	B
2a	5,86	33	1,01	B
1b	6,93	33	1,01	B C
2b	8,81	33	1,01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Figura 17: Análisis de la Varianza y comparación de medias para el volumen apical necrosado para cada una de las metodologías de inoculación.

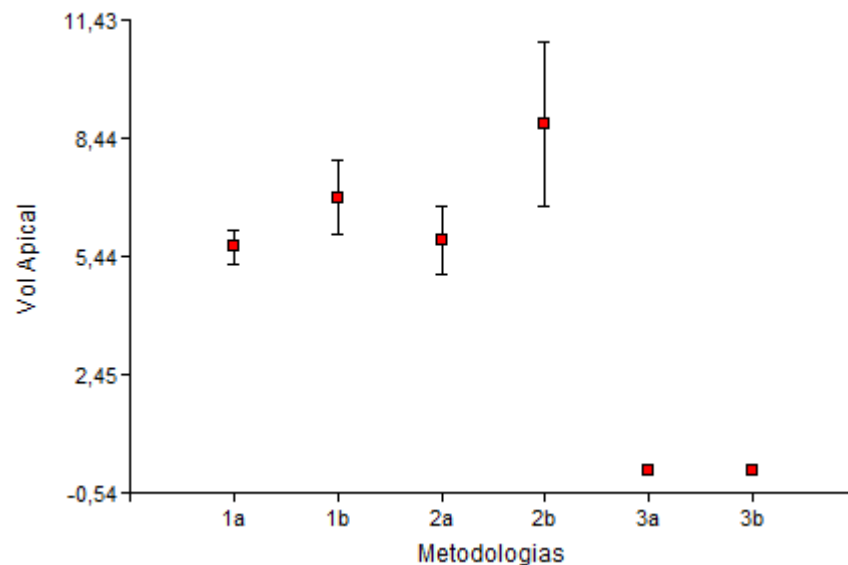


Figura 18: Comparaciones de medias por el test LSD Fisher del volumen apical necrosado (mm^3) para las metodologías de inoculación: 1a) herida más algodón estéril húmedo, 1b) herida más algodón estéril seco, 2a) herida más alta humedad relativa, 2b) herida con baja humedad relativa, 3a) inoculación sin herida más alta humedad relativa y 3b) inoculación sin herida con baja humedad relativa.

ANEXO II

Mediciones para la caracterización de los aislamientos del género *Fusarium*

Tabla 1: Mediciones microscópicas realizadas para la caracterización de los aislamientos del género *Fusarium*.

Aislamiento	Macroconidios (promedio de 30 mediciones en μm)			Microconidios (promedio de 30 mediciones en μm)		
	Largo de conidio	Ancho de conidio	Largo de conidióforo	Largo de conidio	Ancho de conidio	Largo de conidióforo
F13C1	37.24	3.28	-----	9.23	2.54	14.33
F2C1	35.83	3.60	15.25	-----	-----	-----
F19C4	25.04	3.40	19.43	3.20	-----	18.20
F6C6	-----	-----	-----	12.06	2.75	15.43
F24C2b	43.95	3.70	7.56	4.05	1.30	30.56
F16C4	17.17	2.45	15.18	3.34	-----	22.11
F30C1	2.79	2.50	21.52	3.60	1.23	37.12

Tabla 2: Mediciones microscópicas realizadas para la caracterización de los aislamientos del género *Mucillium*.

Aislamientos	Promedio de 30 mediciones en μm		
	Largo de conidióforo	Largo de fiálide	Largo de Conidios
F*01C3b	400	22.00	5.30
F39C1	375	26.13	5.31
F20C4	380	25.73	5.28

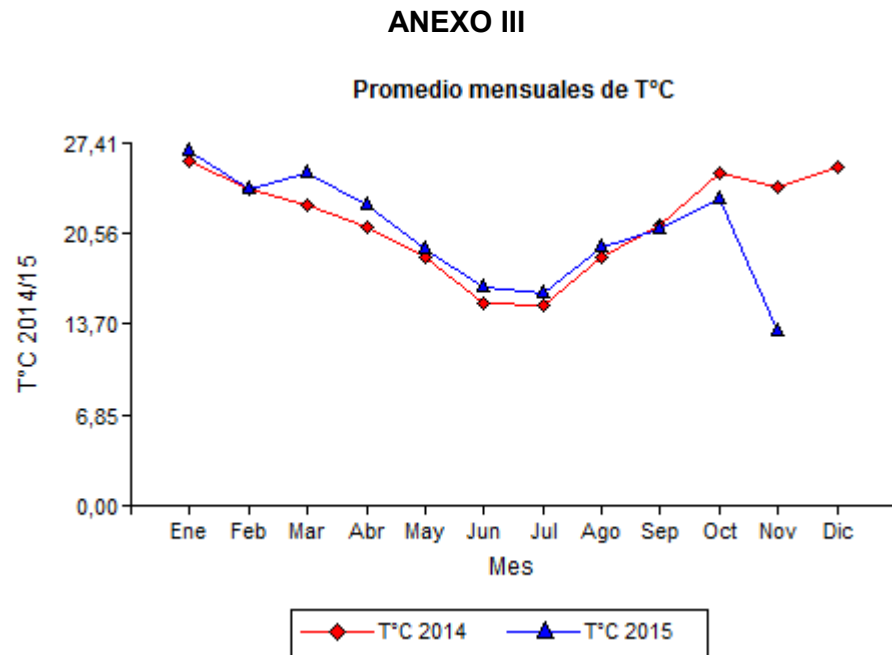


Figura 1: Medias mensuales de temperatura registradas para el año 2014/15 en la zona muestreadas. Datos tomados de la estación meteorológica de la EECT- Yuto, INTA.

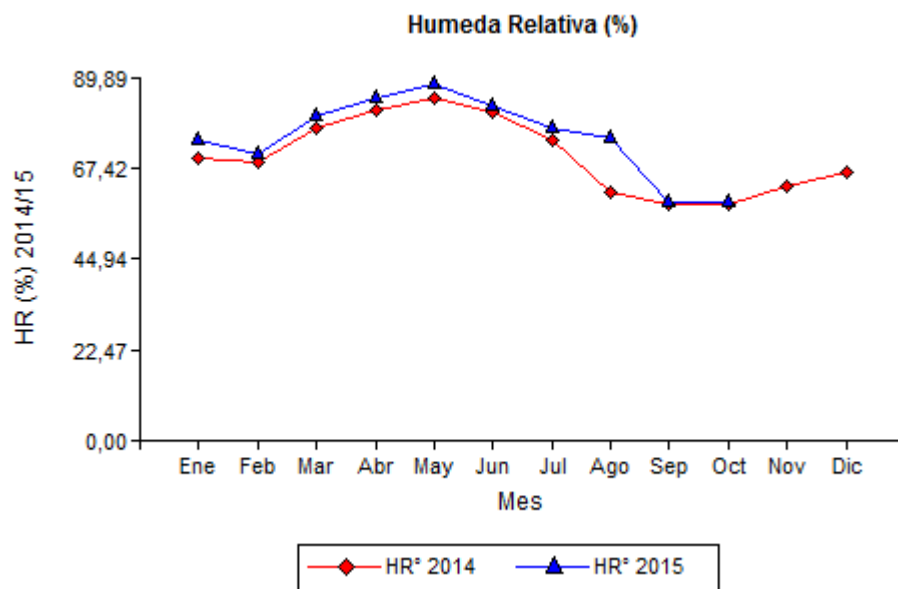


Figura 2: Medias mensuales de humedad relativa (%) registradas para el año 2014/15 en la zona muestreadas. Datos tomados de la estación meteorológica de la EECT- Yuto, INTA.

ANEXO IV

Medios de Cultivos – Soluciones para la extracción de ADN

Medios de Cultivos

- Agar papa dextrosa (APD)

500 ml de agua destilada

5 g de Dextrosa

10 g Agar agar

70 g de papa

0.1 g cloranfenicol

- Agar alcohol (AA)

500 ml de agua destilada

10 g de agar agar

4 ml de alcohol 96°

0.1 g cloranfenicol

- Extracto de malta

500 ml de agua destilada

10 g extracto de malta

0.5 g de Peptona

10 g de glucosa

Soluciones para la extracción de ADN

Tampón de rotura: Tris-HCl pH 8.5, 180 mM; EDTA 10 mM; SDS, 1% (p/v).

Tampón EDTA: Tris-HCl pH 7.5, 10 mM; EDTA 1 mM.

TAE 50X: Tris Base, 24,2 g; EDTA 0.5 M pH 8.0, 10 ml; Ácido Acético Glacial, 5.71 ml; H₂O, hasta completar 100 ml.