



MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR UNIVERSIDAD DE GRANMA

Facultad de Ciencias Agrícolas - Departamento de
Producción Vegetal.

Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo

TÍTULO: Efectividad de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en la producción de posturas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L) var. Habana 92.



AUTOR: Jorge Marcial Molina Ibarra.

TUTORES: Ing. Edil Estrada Abeal.

Ing. Ubail Ávila Medina.

Bayamo, M. N.

2011

“Año 53 de la Revolución”



MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR UNIVERSIDAD DE GRANMA

Facultad de Ciencias Agrícolas - Departamento de
Producción Vegetal.

Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo

TÍTULO: Efectividad de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en la producción de posturas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L) var. Habana 92.

AUTOR: Jorge Marcial Molina Ibarra.

TUTORES: Ing. Edil Estrada Abeal.

Ing. Ubail Ávila Medina

Bayamo, M. N.
2011

“Año 53 de la Revolución”



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo

TÍTULO: Efectividad de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en la producción de posturas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L) var. Habana 92.

AUTOR: Jorge Marcial Molina Ibarra.

TUTORES: Ing. Edil Estrada Abeal.

Ing. Ubail Ávila Medina

2011-2012

“Por la vinculación de la Universidad con los pueblos”

DEDICATORIA

A mis Padres, por esa fuerza tan grande que han tenido para mostrarme que cualquier camino se logra recorrer cuando se hacen las cosas con voluntad, responsabilidad y fe. Por su apoyo incondicional y por brindarme todo su amor en cada momento de mi vida. A ellos que lo han dado todo por mí, va dedicado este trabajo.

Segundo Molina Moreno.

Y

Carmen Ibarra Martínez.

A mi sobrinito, ese pequeño ángel que cuando mal me siento con una simple sonrisa, un beso y con sus travesuras lo resuelve todo, por llegar a constituir ahora el hermano que siempre quise tener.....

Jonathan Andrés.

A mis hermanas, mis mejores amigas, que jamás me han dejado solo en los buenos y más difíciles momentos de mi vida.

Zoila y Patricia

Les dedico con amor.....

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, por darme las fuerzas para llegar hasta aquí y seguir adelante.

A mis padres por su confianza en mí y su apoyo incondicional.

A mis hermanas, por nunca dudar de mí.

A mi sobrino, por entregarme su inocencia y amor sincero.

A mis profesores de la UTC por poner a mi disposición sus conocimientos y enseñarme el camino.

A los profesores de la UDG que en tan poco tiempo han hecho tanto por mí; al MSc. Gustavo González Gómez por guiarme y direccionar mi trabajo, sobre todo a mis tutores: al Ing. Ubail Ávila Medina y en especial al Ing. Edil Estrada Abeal por brindarme sus conocimientos, experiencias y sobre todo su amistad.

Al propietario del semillero Arturo Aguilar Peña, por su confianza en mí y su ayuda desinteresada.

A mis amigos de siempre, los que nunca cambian: Andrés, Anderson, José Luis, y David.

A Yudelis, Blanquita, Dariannys, Sergio, Loli, por su orientación oportuna en los primeros días de estancia en este bello país y en especial a Iliana por ayudarme, guiarme y entenderme en todos los momentos. Gracias

Los llevo en mi corazón y en mis pensamientos,

A todos Muchas Gracias.

Resumen

El experimento se desarrolló en las áreas de semillero del productor Arturo Aguilar Peña, perteneciente a la Cooperativa de Créditos y Servicios Fortalecida “José Arteaga”, ubicada en el poblado de Macuto, Veguita, Yara, provincia Granma, durante el periodo comprendido del 26 de Octubre al 15 de Diciembre del 2011, sobre canteros con un 70% de materia orgánica y 30% de suelo de tipo fluvisol (Hernández *et al.*, 1999), adecuadamente mezclados. La siembra se realizó empleando semillas de tabaco de la variedad “Habana-92, siguiendo un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos (Control, quitosana-300mg.ha⁻¹ y quitosana-350mg.ha⁻¹) con tres repeticiones. La quitosana se aplicó en dos momentos, a los 10 y 25 días después de la germinación. Se evaluó en 20 plantas por tratamiento, al momento de trasplante, la altura de las plantas (cm), anchura de las hojas (cm), la longitud de las hojas (cm), diámetro del tallo (mm), número de hojas, número de raíces. La masa fresca y seca de la parte aérea (g), masa fresca y seca de la raíz (g) se determinó en una muestra de 15 plantas por tratamiento. El procesamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante un análisis de varianza de clasificación simple, utilizando el paquete estadístico STATISTICA, versión 6.0 sobre WINDOWS 2000. Los resultados indicaron que el empleo de la bio-estimulación con quitosana constituyó una alternativa favorable en la producción de posturas de tabaco, mejorando significativamente la calidad de las mismas, con mejores resultados cuando se empleó una dosis de 350 mg.ha⁻¹ de quitosana.

Abstract

The experiment was developed in the area of the seedbed of the producer Arturo Aguilar Peña, membership to the Cooperation of Credit and Strengthen Services "José Arteaga", located in the population of Macuto, Veguita, Yara, province Granma, during the period of 26 of October to the 15 of December 20011, on quarries with a 70% of organic material and 30% of river type soil (Hernández *et al.*, 1999), adequately mixed. The sowing was carried out using seeds of tobacco of the variety Habana-92, following a design complete with three treatments (Control, quitosana-300mg.ha-1 y quitosana-350mg.ha-1) with three repetitions. The quitosana was applied in two moments, the 10th and 25th day after the germination. It was evaluated in 20 plants for treatments, at the moment of transplant, the height of the plants (cm), width of the leaf (cm), the longitude of the leaves (cm), diameter of the stalk (mm), number of leaves, number of roots. The fresh and dry mixture de the aerial part (g), fresh and dry mixture of the root (g) was determined in the sample of 15 plants for treatment. The statistical processing of the data obtained was carried out by an analysis of simple classification variance, using the statistical pack STATISTICA, version 6.0 in WINDOWS 2000. The results indicated that the use of the bio-stimulation with quitosana provided a favorable alternative in the production in the tobacco seedling, improving significantly the quality of the mentioned, with better results when a dose 350mg.ha-1 of quiosana was used.

Índice.

I.- INTRODUCCIÓN	1
Problema	3
Hipótesis	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1.- Origen y distribución del cultivo del tabaco	5
2.2.- Importancia del cultivo del tabaco	6
2.3.- Exigencias ecológicas	8
2.4.- Exigencias edáficas	10
2.5.- Exigencias nutricionales del cultivo	12
2.6.- Producción de Posturas	14
2.6.1.- Concepto de semilleros y aspectos generales	14
2.6.2.- Clasificación de semilleros	14
2.6.2.1.- Semilleros en bandejas	15
2.6.2.2.- Bandejas aéreas	15
2.6.2.3.- Bandejas flotantes	15
2.7.- Preparación del semillero y características de preparación de suelos	16
2.8.- Características de la variedad “Habana 92”	17
2.9.- Aspectos generales sobre La Quitosana	18
2.9.1.- Obtención y características de la Quitosana	18
2.9.2.- Aplicaciones de la Quitosana	21
2.9.2.1.- Tratamientos de agua	21
2.9.2.2.- Biotecnología	21
2.9.2.3.- Agricultura	21
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1.- Montaje de la investigación	25
3.2.- Realización de la siembra	25
3.3.- Atenciones al semillero	26
3.4.- Tratamientos evaluados	26
3.5.- Diseño experimental	26
3.6.- Aplicación de la quitosana	26
3.7.- Evaluaciones realizadas	26
3.8.- Análisis estadístico	27
3.9.- Valoración económica	28

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1.- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el número de hojas en el momento del trasplante	29
4.2.- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en la longitud de la hoja en el momento del trasplante	29
4.3.- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el ancho de la hoja en el momento del trasplante	30
4.4.- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en la altura de las plantas en el momento del trasplante	30
4.5.- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el diámetro del tallo en el momento del trasplante	31
4.6.- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el comportamiento de la masa fresca y seca de la parte aérea y de la raíz	32
4.7.- Valoración económica	33
V.- CONCLUSIONES	35
VI.- RECOMENDACIONES	36
VII.- BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	48

I- Introducción.

La planta de tabaco llegó a Europa desde América, al igual que la patata o el maíz. Tras ser condenada por la Inquisición, se puso de moda en el siglo XVI, primero como planta ornamental y después por el uso medicinal y lúdico de sus hojas secas (Infoagro, 2011). Los límites geográficos del cultivo del tabaco se encuentran aproximadamente, entre 60° de latitud Norte y 45° de latitud Sur. El tabaco, ocupa una posición sin paralelo entre las plantas cultivadas, en lo que respecta a algunas características individuales, mientras que en términos generales esta especie ha logrado una situación realmente notable (López *et al.*, 1983).

La distribución en porcentaje de la producción de tabaco entre los continentes, es de 44,8% en Asia, 23,6% en América del Norte, 19,8% en Europa, 6,5% en América del Sur, 4,9% en África y 0,4% en Oceanía (Akehurst, 1973; Mari y Hondal, 1991).

La demanda mundial de tabaco seguirá aumentando en los próximos años, debida en gran medida al crecimiento de la población y de los ingresos, pero la tasa de crecimiento será inferior a la registrada hasta ahora. El número de fumadores pasará de los 1.100 millones a unos 1.300 millones, lo que significaría un aumento anual en torno a 1.5 % (FAO, 2004). Este mismo autor considera que la producción global sobrepasará los 7.1 millones de toneladas de hojas de tabaco en el 2010, un aumento considerable respecto a los 5.9 millones de toneladas producidas en 1997/1999.

Por su significado religioso original, se le considera un producto de efectos médicos beneficiosos, pero con más frecuencia se ha demostrado que constituye un peligro indudable para la salud (Galantini *et al.*, 2004).

El tabaco es además, una planta medicinal pues es narcótico, purgante y antiparasitario. Se le emplea comúnmente como insecticida, en decocción. Su principio activo es la nicotina, que se emplea como antitetánico y contra la parálisis de la vejiga. También se usa en inyecciones (Roig y Mesa, 1975), además Tso (1977); ha aislado la proteína (F1) del tabaco al comprobar su eficaz utilización como alimento para humanos.

En Ecuador existen 1 700 hectáreas (ha) de cultivos en Guayas (88%), Los Ríos (7%) y El Oro (5%). El sector está formado por más de 3 000 productores que venden la hoja de tabaco a Tanasa, Itabsa y Proesa, afiliadas a la multinacional de cigarrillos Philip Morris International. En Ecuador los semilleros se instalan en abril y el corte de hojas va de agosto a noviembre. Es requisito tener riego. Las tareas más exigentes del cultivo son: control fitosanitario, aporque, trasplante, cosecha y clasificación. Todo responde a un estricto programa (Gómez, 2011).

En Cuba, la producción de este cultivo se desarrolla en cinco regiones conformada a partir de la nueva estructura tabacalera (Pinar del Río, Ciudad Habana, Centro oeste, Centro este y Oriente – Camagüey), que en su conjunto abarcan un área de 65000 ha, destacándose el tabaco negro ya sea al sol ensartado, sol en palo y tapado, el cual representa más del 85% de estas áreas, destinada para la fabricación de puros y en menor escalas de cigarrillos fuertes (Díaz *et al.*, 1997).

La provincia de Granma por sus excelentes condiciones de suelo y clima y sus tradiciones en el cultivo, está llamada a ser la de mayor producción tabacalera en la región Oriental, para satisfacer a la industria de materia prima, para el consumo nacional y la exportación (Ramírez, 2007).

MINAGRI (2001) plantea que en la producción tabacalera se necesitan suficientes cantidades de fertilizantes para que las plantas crezcan con razonable rapidez, sin embargo el rendimiento del tabaco en la campaña 2010-2011 según Oficina Nacional de Estadísticas (ONE, 2010) fue de $1,01 \text{ t.ha}^{-1}$ en 20256 ha plantadas, lo que puede estar dado por la carencia de tecnologías adecuadas a las condiciones edafoclimáticas, fundamentalmente las relacionadas con las exigencias nutricionales de este cultivo y la calidad de las posturas. El desarrollo tecnológico hacia formas más sostenibles permiten reducir cada vez más el efecto negativo de la contaminación ambiental (Gómez, 2000).

Mojena y Cruz (1998) señalaron, que el agotamiento del espacio agrícola implicará en un futuro no muy lejano, tomar medidas que faciliten o permitan establecer sistemas de producción que estén acorde con la protección del medio ambiente, la conservación del suelo y la producción balanceada de alimentos.

Altieri (1997), Moya y Varela, (1998) consideran que puede contribuir a este propósito, el uso de rotaciones de cultivos secuenciales y en el espacio, a través del uso de cultivos de cobertura, cultivo inter-cosechas, la aplicación de fertilizantes orgánicos y bioestimulantes, mientras que Gardón (2005) refiere la reducción de productos químicos, y abonos orgánicos entre otras, son las mejores opciones para garantizar altos rendimientos con calidad sin afectar el medio ambiente.

En tal sentido, dentro del actual proceso tecnológico para el cultivo, se tiene como premisa insertar la aplicación directa a las plantaciones de estimulantes biológicos, con capacidad suficiente de participar en los principales procesos metabólicos del cultivo (Rodríguez, 2001), los cuales, de acuerdo a Pita *et al.* (2001) y Zullo *et al.*, (2002) son ecológicamente seguros y que a muy bajas concentraciones estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas y por consiguiente incrementan el rendimiento.

La quitina es un polisacárido no tóxico y biodegradable que forma una sustancia córnea y es el principal constituyente del exoesqueleto de insectos, crustáceos y arácnidos. Los residuos de procesados de mariscos contienen en general un 14-35% de quitina asociada con proteínas de 30-40%, lípidos, pigmentos y depósitos de calcio de 30-50% estimándose, una producción mundial anual de quitina en los residuos de 120.000 toneladas (Falcón *et al.*, 2004).

La quitosana actúa como un bioestimulante de plantas en tratamientos de semillas, raíces, hojas y en tratamientos post-cosecha de frutos y verduras con el fin aumentar su conservación Carhuapoma y Santiago, (2005), recubrimientos de semillas, conservación de frutos, protección frente a plagas y hongos, virucida y estimulante del crecimiento de las plantas.

PROBLEMA.

En las condiciones de producción de la Cooperativa de Créditos y Servicios “José Arteaga” es aún deficiente la calidad de las posturas obtenidas a partir de la utilización de la tecnología tradicional de producción.

HIPÓTESIS.

Con la aplicación de diferentes dosis de quitosana es posible incrementar la calidad de las posturas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.), durante su establecimiento en condiciones de semillero bajo la tecnología tradicional de producción de la CCS “José Arteaga”.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la efectividad de la aplicación de dos dosis de quitosana en la producción de posturas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) var. Habana 92.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la mejor dosis de aplicación de quitosana en la producción de posturas de tabaco.
- Evaluar la influencia de la dosis de aplicación de quitosana en los principales indicadores de calidad de las posturas.
- Determinar los efectos económicos de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el cultivo de tabaco, durante la etapa de semillero.

II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1- Origen y distribución del cultivo del tabaco.

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es una planta originaria de América del Sur, de la región montañosa de los Andes y el área dedicada a este cultivo es la que está cubierta por México, América Central, el Caribe y parte de América del Sur. Se cree que esta especie es un híbrido natural, originado entre dos especies del mismo género *Nicotiana silvestre* y *Nicotiana tomentosiformis* (Roig y Mesa, 1975; Quintana, 1981; Mayea *et al.*, 1983; Espino, 1997).

El género *Nicotiana* comprende más de cincuenta especies, de las cuales *Nicotiana tabacum* L. nunca se reportó en estado silvestre; las hojas de esta planta en sus diversas formas tienen gran repercusión en todo el mundo; comúnmente se conoce con el nombre de tabaco (Akehurst, 1973). Señaló, además, que la mayor parte del tabaco mundial procede principalmente de allende los trópicos o de zonas de gran altitud. Refirió que los tabacos y las hojas para envoltura de los cigarrillos más densos curados al aire proceden de estas zonas.

En nuestro país, el tabaco es una de las plantas más antiguas de cultivo. Se hace referencia a ella por primera vez en el diario de a bordo de Colón cuando llegó a nuestra Isla en 1492, donde anotó que habían hallado gente con tizones de hojas envueltas encendidos, para tomar sus heumerios. Además, el tabaco era utilizado con fines religiosos, al igual que en otros países (Mari y Hondal, 1991).

En 1611 se incrementó el desarrollo del cultivo con fines comerciales. Las primeras vegas comerciales se implantaron a orillas del río Almendares, en La Habana, en las márgenes del río Raimo, en la región central del país, y también en los alrededores de Bayamo (Mari y Hondal, 1991).

Según Consejo Nacional de Patrimonio Cultural en el siglo XVII se afianzó el cultivo de tabaco y los campesinos se convirtieron en el principal promotor de la preciada hoja. En un primer momento se sembraba a orillas de los ríos, cerca de las villas y ciudades. La Habana y sus alrededores devienen importantes zonas del cultivo (Santiago de las Vegas, Bejucal y San Miguel del Padrón). La oposición de los

cabildos manejados por elementos de la oligarquía determinó que el cultivo del tabaco tendiera alejarse de la ciudad. Huyéndole por una parte a las regulaciones oficiales, y por otras en busca de los ríos, comienzan a conocerse los territorios de San Cristóbal, Palacios, Río Hondo, Guamá, San Juan y Cuyaguatije como parte de un lento proceso de ocupación... Era notable la diferencia entre el cultivo de estancia o conuco y el tabaco de vegas producido generalmente a orillas de los ríos.

Los límites geográficos del cultivo del tabaco se encuentran aproximadamente, entre 60° de latitud Norte y 45° de latitud Sur. La distribución en porcentaje de la producción de tabaco entre los continentes, es de 44,8% en Asia, 23,6% en América del Norte, 19,8% en Europa, 6,5% en América del Sur, 4,9% en África y 0,4% en Oceanía (Akehurst, 1973; Mari y Hondal, 1991). Además señalaron que a mediados del siglo XVI, China y Japón se convirtieron en grandes productores, sobre todo en la producción de tabaco ligero que fueron utilizados en la fabricación de cigarrillo para el consumo interno.

Desde los tiempos coloniales, las zonas productoras de tabaco en Cuba son: Zona de Vuelta abajo, Zona de Semivuelta, Zona de Partido, Zona de Vuelta arriba y Zona Oriental (Núñez, 1997).

El cultivo del tabaco en Cuba está concentrado en la región occidental: Provincia de Pinar del Río y La Habana; región central: Provincia de Las Villas y Santi Spíritus y en la región oriental: Provincia Granma (Díaz *et al.*, 1997), señalaron que exclusivamente en la zona de Vuelta abajo y Partido es donde se obtienen las tradicionales calidades de hojas que permiten la producción de las grandes marcas de torcidos.

2.2 - Importancia del cultivo del tabaco.

El tabaco, ocupa una posición sin paralelo entre las plantas cultivadas, en lo que respecta a algunas características individuales, mientras que en términos generales esta especie ha logrado una situación realmente notable (López *et al.*, 1983).

- Es una de las poquísimas cosechas que llegan al mercado mundial totalmente en base de la hoja.

- Es la planta comercial no comestible más cultivada en el mundo.
- En muchos países es un instrumento de enorme importancia en la política financiera y económica.
- Se consume fumándolo, inhalando su polvo (rapé) y masticándolo.

El área mundial ocupada por tabaco alcanza 4,4 millones de hectárea con una producción de tabaco en rama de seis millones de toneladas. La producción de tabaco en el mundo se comporta de la forma siguiente: América del Norte un millón de toneladas, China un millón de toneladas, Europa 750 mil toneladas, América del Sur 500 mil y África 750 mil toneladas de tabaco al año. Para la economía del país, el cultivo del tabaco reviste gran importancia, al tener en cuenta sus amplias posibilidades con respecto a los mercados internacionales y además los precios que en los mismos prevalecen, que ha permitido que se incrementen sus exportaciones (López *et al.*, 1983, citado por Vázquez (2004).

La importancia del tabaco radica en el creciente consumo, no sólo en lo que respecta a los tipos más corrientes, sino especialmente a los de cualidades selectas, sin que su elevado precio sea un obstáculo para ello, como queda demostrado en el incremento mundial de su consumo.

López *et al.*, (1983), citado por Nieto *et al.*, (2001) señalaron que por las características de este cultivo, es una planta no comestible y se consume al fumarlo, inhalarlo o masticarlo, se muestran a continuación los elementos que contienen las hojas: carbohidratos (10 – 20%), ceniza (15%), alquitrán (4 – 7%), nicotina (1 – 6%) y aceites esenciales (1,5%). Reportaron que cuando el contenido carbohidratos es alto y la cantidad de proteína es baja, favorece la calidad del tabaco.

Al cierre del año 1999 se alcanzó una producción de 160200 millones de habanos para la exportación lo cual representó un crecimiento superior al 60% con relación a la producción de años anteriores (Arenas, 1998).

Como narcótico formador de hábitos es objeto de constantes ataques encaminados a moderar o interrumpir su uso, a pesar de lo cual su consumo se mantiene e incluso se incrementa, aunque en nuestro país ha disminuido considerablemente según

Castro (2001) se le considera un producto de efectos médicos beneficiosos, pero con más frecuencia se ha demostrado que constituye un peligro ineludible para la salud.

Ares *et al.*, (1999), señalaron que se han reportado usos terapéuticos para la F1, ya que la ausencia de sodio y potasio en ella, puede reducir considerablemente la frecuencia de hemodiálisis en pacientes con insuficiencia renal cuyas dietas hayan sido enriquecidas con F1. Con anterioridad, Montari (1993), citado por Ares *et al.*, (1999) planteó que en estos pacientes se puede suplementar a 50% con F1 vía oral, a razón de $0,9 \text{ g.kg}^{-1}$ de peso corporal, hasta completar 31 g.kg^{-1} de F1 diario, además, señaló que puede utilizarse en pacientes bajo estrés (trauma, coma, infecciones, etcétera). Según científicos norteamericanos aseveran que a partir del tabaco se puede obtener más proteínas por hectáreas que con ningún otro producto agrícola (García, 1989).

2.3- Exigencias ecológicas.

El tabaco es una planta que se cultiva bajo las más variadas condiciones de clima en todo el mundo. Pocas plantas son comparables con este, por su adaptabilidad a los diferentes climas. Un ejemplo de ello pudiera ser la adaptabilidad del tabaco negro, fundamentalmente, a las condiciones climáticas de Cuba, en los que presenta un aroma, una combustibilidad y un sabor, entre otras propiedades, que le permiten ocupar uno de los lugares cimeros en la preferencia de los fumadores (Mari y Hondal, 1991).

De las plantas cultivadas, el tabaco es una de las que más responde a las condiciones del medio. Sus características físicas y químicas varían grandemente de acuerdo con las particularidades del lugar donde se cultiva (Elliot, 1970; Guerra *et al.*, 1999). Por otro lado López *et al.* (1983) señalaron que el valor comercial que alcanza el tabaco depende mayormente de las condiciones externas, las que ejercen gran influencia sobre la planta y afectan su metabolismo.

La temperatura óptima para el cultivo varía entre 18 y 28 °C. Se necesitan aproximadamente $3\ 700$ °C para completar su ciclo vegetativo. Una temperatura relativamente elevada dentro de los límites señalados, a la vez que favorece la germinación y el desarrollo de la planta hasta alcanzar su floración, estimula, así

mismo, la absorción de los elementos nutritivos del suelo y las demás funciones fisiológicas del vegetal (Mari y Hondal, 1991). Por otro lado, Espino (1997), planteó que las temperaturas óptimas para el cultivo están entre 20 y 25 °C, por debajo de 14 °C el desarrollo es muy lento, ya que disminuye la actividad del torrente circulatorio y por encima de 35 °C pueden producirse quemaduras, especialmente en los brotes tiernos.

Las temperaturas del aire afectan el crecimiento y la demanda de nitrógeno de las plántulas de tabaco, mientras que la temperatura y la disponibilidad de nitrógeno en la zona radical altera la capacidad de las raíces de suministrar nitrógeno a la planta (Osmond y Raper, 1982).

El máximo tamaño y la mejor calidad de la hoja se obtiene cuando se consigue una adecuada turgencia y se mantiene lo más constante durante todo el ciclo vegetativo, lo que requiere un porcentaje de humedad conveniente, tanto en el suelo como en el aire (Medina y Valdés, 1986; Mari y Hondal, 1991).

Gómez *et al.*, (1998), refiere que una disminución de humedad relativa provoca incrementos en la evaporación del agua del suelo y la transpiración de la planta, lo que implica una aceleración en el movimiento de la savia, lo que incide en la lignificación de los tejidos, que en el caso del cultivo del tabaco, se traduce en mala calidad de la hoja. Cuando la humedad relativa es de aproximadamente del 70%, el tabaco tiene buen desarrollo y buena calidad.

La repartición de las lluvias y el estado higrométrico son dos factores de gran importancia; un exceso de humedad influye grandemente sobre las funciones útiles de la planta, tales como la respiración y la transpiración. En la respiración, cuando existe un exceso de humedad se ve afectada, ya que existen dificultades con el intercambio gaseoso, a causa de que los poros del suelo se encuentren llenos de agua. Los períodos críticos de abastecimiento de agua comprenden el arraigo, la formación de las plántulas y el crecimiento rápido de los tallos (López *et al.*, 1983). Además señalaron que en nuestras condiciones el tabaco se siembra y se cultiva en los meses de poca lluvia, por lo que se hace necesario el uso de riego con frecuencia de seis a ocho días para suministrarle al cultivo una norma de 2 240 m³.ha⁻¹. En Cuba

los meses de más baja humedad relativa (70 a 75%) se registra en los meses de febrero, marzo y abril; coincidiendo con la etapa de pleno crecimiento vegetativo y de cosecha (Aragón, 1994). Además un exceso de humedad es perjudicial para el cultivo, ya que propicia incidencias de plagas y enfermedades (Torrecilla *et al.*, 1999).

El tabaco es una planta heliófila, ya que la luz tiene gran influencia sobre el desarrollo de la planta y la calidad de la hoja obtenida (López *et al.*, 1983), además plantearon que en ausencia de la luz, las plantas normales sufren aislamiento, es decir pierden sus pigmentos por una serie de transformaciones bioquímicas. Por otro lado reportan que un exceso de luz es perjudicial, ya que destruye las moléculas de clorofila. La luz influye en el contenido de nicotina en la hoja; de esta forma, las hojas situadas en la parte inferior de la planta tienen menor nicotina que las del centro y de la corona.

La interacción de la luz es imprescindible en la realización de fenómenos fisiológicos vitales para la fotosíntesis y la transpiración del vegetal, funciones cuya actividad y consecuencias en este cultivo se reflejan intensamente sobre la calidad de la hoja obtenida, el tabaco cultivado bajo la acción de una luz intensa, por consiguiente rico en clorofila, es de hoja reducida y contiene gran cantidad de materia nitrogenada y de mucha goma y resinas. Después de su curación toma un color oscuro y resulta muy fuerte, por lo cual no es apetecible (Mari y Hondal, 1991).

Los vientos suaves, como los alisios que predominan en Cuba, renuevan las capas de aire, arrastran las masas de vapor de agua en exceso y atenúan el efecto del calor exagerado; sí por el contrario el viento es cálido y fuerte, ocasiona la desecación del suelo y de las plantas. Puede producir quemaduras y las hojas pierden gran cantidad de agua (Arias *et al.*, 2000).

2.4- Exigencias edáficas.

El suelo debe ser suelto, con buen drenaje. Un suelo óptimo debe reunir las condiciones siguientes: poseer 75% de arena de sílice, ocho a diez por ciento de arcilla, de cero a diez por ciento de limo, de tres a cuatro por ciento de materia

orgánica y un pH de ligeramente ácido (López *et al.*, 1983). Los tabacos negros de sol ensartado, en las provincias centrales, orientales y algunas zonas de las provincias occidentales, dedican este tipo de producción a la obtención de hojas para torcidos, cigarrillos fuertes y ramas, se desarrollan en suelos con las siguientes características: en los primeros 20 cm de profundidad tienen un contenido de materia orgánica de 2,5% y pH, por lo general, es ligeramente ácido o ligeramente alcalino, aunque está demostrado que el tabaco prefiere un suelo con reacción ácida o ligeramente ácida donde el pH oscile entre 5,0 y 6,0.

El suelo fluvisol es un suelo joven utilizado por primera vez para el cultivo del tabaco, profundo de textura loam arcilloso, buena estructura, buen drenaje y poco erosionado es un suelo considerado apto para el cultivo según el Laboratorio de Suelo de la provincia Granma.

El tabaco es una planta que se adapta a los suelos más diversos, tanto en su textura como en su estructura, lo que explica, en parte, la extensa área en la que se cultiva. Sin embargo, la influencia del suelo en la cantidad y calidad de la cosecha justifican la no utilización de muchos suelos en las que este cultivo sería poco económico. Por otro lado plantean que los suelos de un alto porcentaje de arcilla y materia orgánica dan origen a plantas muy desarrolladas con hojas grandes, venosas, de color verde oscuro y sabor amargo y fuerte. Los suelos ligeros con buen contenido de humus producen hojas finas, suaves, poco venosas, con buena combustibilidad y calidad excelente (Mari y Hondal, 1991).

En general, los cultivos en suelos ligeros tienden a tener mejor proliferación radical en comparación con el cultivo en suelos negros. El tamaño y la salud del sistema radical desarrollado durante el primer mes después del trasplante influyen grandemente en el desarrollo (y posterior rendimiento) foliar durante el segundo mes después del trasplante (Prasada, 1982).

En la región Central y Oriental del país, los suelos más explotados en el cultivo del tabaco son los Húmicos calcimórficos, Pardos sialíticos y Fluvisoles, dentro de los agrupamientos señalados se destacan los suelos Fluvisoles que alcanza área para el

cultivo de 0,4% del 53,8% que representa en la región Oriental del país, lo cual muestra que existen potencialidades por explotar (MINAGRI, 2001).

Mari y Hondal (1991) señalaron que los suelos salinos no son convenientes para el cultivo del tabaco, ya que el cloro disminuye la combustibilidad de la hoja. Lo mismo ocurre cuando la alcalinidad es elevada; si los porcentajes de cal son moderados, los efectos de dicha cal son beneficiosos, ya que facilitan la precipitación de los coloides y la adecuada granulación, con el consiguiente incremento de la porosidad.

MINAGRI (1998) señala que uno de los problemas más serios relacionados con los suelos en explotación de tabaco lo constituyen las pérdidas valiosas de sus materiales constitutivos más importantes y su riqueza nutricional, a través de su enemigo más implacable: la erosión, la cual está asociado a un manejo inadecuado del suelo, en el que se han obviado principios importantes como la de las medidas de conservación asociadas con la rotación de cultivos, el respecto de las normativas en preparación de suelos, el uso de prácticas conservacionistas de diferentes tipos y la explotación adecuada de la fertilidad del suelo, con las restricciones correspondientes en fertilizantes químicos y orgánicos. Entre las medidas más importantes para el mejoramiento de los suelos están; aplicación de materia orgánica, incorporación de abonos verdes (millo, terciopelo, maíz, etc.), uso de rotación y alternancia de cultivos y prácticas de encalado, para mejorar el pH y la búsqueda efectiva de fuentes de materia orgánica de fácil acceso y económicamente más viable para el agricultor.

2.5 - Exigencias nutricionales del cultivo.

Tariman y Majumder (1982) encontraron un efecto irregular en el rendimiento del tabaco, mejoró la calidad físicas de la hoja con altas dosis de potasio y disminuyó con el aumento de las dosis de nitrógeno. Las cualidades deseadas de humo, incluyendo un bajo nivel de nicotina, fueron mejoradas por la fertilización potásica, mientras que las altas dosis de nitrógeno se obtuvieron hojas que produjeron humo fuerte y denso y un alto contenido de nicotina.

El nitrógeno es considerado un elemento importante para el tabaco, ya que afecta el crecimiento y desarrollo de la planta, así como la calidad de la hoja. Su

concentración total se incrementa generalmente de las hojas basales o sea de la hoja libre de pie hacia las apicales. El síntoma más característico de la insuficiencia de nitrógeno, de la planta en crecimiento, es el cambio de coloración de verde brillante de gran intensidad por un verde amarillento pálido, que se hace más agudo especialmente en las hojas más viejas, las cuales al final se vuelven amarillas y tienden a quemarse o secarse y el desarrollo de la planta se retarda, se obtiene un tallo pequeño y las hojas son de tamaño reducido. Por otro lado un exceso de nitrógeno afecta la calidad del tabaco; determinada fundamentalmente por la combustibilidad, el color y otras propiedades, además retasa la floración, la maduración y estimula el ahijamiento. El contenido deseable de nitrógeno en los tabacos para torcidos es de aproximadamente 3% (Mari y Hondal, 1991).

El fósforo es vital para el metabolismo de la planta. Estos mismos autores (1991) señalan que en las hojas tiernas del tabaco, alrededor de un 30% del mismo está presente en forma de ácidos ribonucleicos y un 7% como ácido desoxirribonucleico. Una deficiencia de este elemento se manifiesta en el crecimiento y maduración retardado, cuando es grande reduce considerablemente el rendimiento de la planta. Su función más importante es la promoción de la maduración. Estimaron que la aplicación de 65 a 100 kg.ha⁻¹ de fósforo en su forma asimilable en el surco, es suficiente para satisfacer las exigencias en el cultivo del tabaco. El potasio es el elemento más importante para el cultivo, ya que tiene gran efecto sobre la calidad y el rendimiento del mismo, estimula la formación de carbohidratos e influye positivamente en la síntesis de proteínas. En algunos ensayos (Mari y Hondal, 1991) observaron que el máximo rendimiento se obtenía con aplicaciones de 300.kg.ha⁻¹ de potasio, mientras que la calidad era máxima con 330 kg.ha⁻¹ de este elemento.

De forma general López *et al.* (1983) señalaron que los efectos que producen los elementos (N-P-K) en la planta son de gran importancia: el nitrógeno interviene en las propiedades físico-químicas de la hoja. Aportes normales de este elemento originan hojas anchas y finas, características fundamentales en la producción tabacalera. El fósforo influye en el color y curado de la hoja, en tanto que el potasio proporciona hojas de alto valor comercial por cuanto se benefician en varias características físicas como son: color, combustibilidad, y un sabor, entre otras

propiedades, que le permiten ocupar uno de los lugares cimeros en la preferencia de los fumadores.

2.6- Producción de posturas.

2.6.1- Concepto de semillero y aspectos generales.

Se le llaman semillero, sementera o almaciga, al lugar destinado a desarrollar determinadas plantas que más tarde serán trasladadas a otros lugares para su posterior desarrollo. El empleo de semilleros se justifica en aquellas especies vegetales, como el tabaco, que por determinadas circunstancias no deben ser situadas en su lugar definitivo que por presentar semillas muy pequeñas y de escasa resistencia no toleran a siembra directa. Además, es muy difícil poder prodigarles las condiciones de humedad y atenciones necesarias en extensas áreas de producción, por lo cual es necesario desarrollarlas en un medio donde existan factores controlados, hasta que una vez alcanzado cierto grado de desarrollo, puedan ser trasladadas sin grandes dificultades, como sucede, por ejemplo, en el caso de algunas hortalizas y en el tabaco.

2.6.2- Clasificación de los semilleros.

Existen diversas formas de clasificación de los semilleros, según distintas características diferenciales. Desde el punto de vista de la producción tabacalera están los semilleros tecnificados y los tradicionales o a campo abierto (Mari y Hondal, 1984).

En Cuba existen tres tecnologías fundamentales para producir las posturas de tabaco, ellas son los semilleros tecnificados, en el cual el sustrato empleado es en base a materia orgánica, el semillero tradicional que es el más empleado y que como sustrato se utiliza directamente el suelo y por último a partir de la década de los 90 ha cobrado auge la producción de posturas en bandejas tanto en condiciones de semillero aéreo como de bandejas flotantes (Hernández, 2011).

2.6.2.1- Semilleros en bandejas.

Se trata de la producción de plántulas en bandejas, de polipropileno expandido, que se llenan con sustrato esterilizado donde se siembran (una por alveolo) las semillas desnudas y pueden realizarse por dos vías: sistema aéreo y flotante.

2.6.2.2- Bandejas aéreas.

Desde la campaña 1999 – 2000 se comenzó a trabajar en la empresa de Ceballos, Ciego de Ávila, el sistema de producción de posturas en bandejas aéreas, que consiste en colocarlas después de sembradas en un soporte, a modo de meseta, donde recibe el abastecimiento de agua por riego aéreo, a diferencia del flotante que lo recibe por sub-irrigación (**Figura 1**), ver anexo.

Ventajas del sistema:

- No propagación de enfermedades a través del agua de las balsas.
- Fácil manejo del riego.
- Utilización del fertirriego.
- Sistema radical vigoroso.
- Cepellón bien definido.
- Facilidad en la realización de las labores fitotécnicas.

2.6.2.3- Bandejas flotantes.

Desde hace algunos años se comenzó a introducir en la práctica productiva un nuevo sistema de producción de plántulas, la tecnología de bandejas flotantes, que consiste en colocar las bandejas después de sembradas en una balsa de agua, previamente fertilizada cuando el fertilizante poco soluble, o se fertiliza a la semana cuando el fertilizante es altamente soluble (Espino, 1998).

Este sistema presenta varias ventajas respecto al semillero tradicional:

- Plántulas de calidad, sanas y robustas.

- Sistema radical vigoroso y fuerte, con cepellón que evita el estrés del trasplante.
- Más de 98% de supervivencia en el campo.
- Ahorro de pesticidas, agua y fertilizantes en un 70%.
- Se pueden realizar los semilleros cerca de las vegas.
- Altos rendimientos de plántulas (800 plántulas/m²).

2.7- Preparación del semillero y características de la preparación de suelos.

Como los semilleros son el lugar donde se depositan las semillas, en el que las plantas deben de vivir y desarrollarse hasta que llegue el trasplante, el éxito o fracaso de la cosecha depende en gran medida de su estado de salud y desarrollo, lo primero que se debe considerar es la selección del área que debe ser aproximadamente 1cab de extensión con el propósito de obtener posturas bien desarrolladas y con la calidad deseada.

La tierra del área debe ser suelta y poco adherente para que las raíces de las plantas no se dañen en el momento de arrancar la postura; la topografía ligeramente ondulada, con una pendiente de 5%. Es preferible utilizar un terreno que no se haya cultivado durante varios años, ya que en estos no se produce mucha hierba porque, así se evitan las labores de escarda, las enfermedades y las plagas. Este terreno deberá estar situado en lugares de buena exposición a la luz y en los que el aire circule libremente, tiene que tener garantizado el suministro de agua de forma que se pueda regar con tanta frecuencia como sea necesario (Mari y Hondal, 1984).

Las primeras operaciones que se realizan en los semilleros llamados tradicionales son las relacionadas con el laboreo del suelo, esta actividad por lo general se inicia en los meses de julio y agosto. El diminuto tamaño de la semilla (un gramo de semilla contiene entre 10 y 12 mil semillas) y por tanto la imposibilidad de enterrar las mismas implica que la preparación del suelo deba cumplimentar los siguientes objetivos:

- Ausencia de malezas y de restos vegetales en descomposición.
- Profundidad entre 25 y 30 centímetros.
- Superficie del suelo bien mullida sin llegar a pulverizar la superficie
- Adecuada uniformidad del terreno.
- Mínima agresión al medio ambiente.

2.8- Características de la Variedad `Habana 92'

La variedad `Habana 92' es producto de un cruzamiento entre la variedad `Corojo' de origen cubano y la variedad polaca 'R x T,' de la cual hereda la resistencia al moho azul (*Peronospora tabacina* Adam).

Cultivada al sol presenta una altura con inflorescencia entre 160 y 170 cm., con un número variable de hojas útiles las cuales en dependencia del suelo donde se cultive, pueden ir de 14 a 18 cm, con una distancia media de entrenudos de 7 cm. El ancho máximo de estas hojas puede estar entre 20 y 25 cm, con una longitud promedio de 40-45 cm. Su ciclo es de 60-62 desde el trasplante hasta la apertura de las primeras flores. Las hojas se caracterizan además, por su color verde brillante y por ser muy estrecha en su base (poca barba) (MINAGRI, 1998).

El potencial promedio de rendimiento de esta variedad bajo tela es de 2 200 kg.ha⁻¹, al sol ensartado 1 900 kg.ha⁻¹ y a sol en palo en las provincias orientales y centrales 2 743 kg.ha⁻¹, de los cuales cerca del 40 % son de capaduras suelen demorarse en aparecer los rebrotes, por lo general solo se le hace uno o dos cortes de capaduras.

Esta variedad es resistente al moho azul, a la pata prieta a la necrosis ambiental y a la mancha parda o negrón. Es la primera variedad obtenida en Cuba, que posee una alta tolerancia al Orobanche (*Orobanche ramosa*, L) y al encharcamiento por exceso de agua. Es susceptible al virus del mosaico del tabaco. Se adapta a diferentes tipos de suelo, se recomienda para el cultivo al sol en palo, exceptuando aquellos lugares donde escasea el agua (MINAGRI, 2001).

2.9- Aspectos generales sobre La Quitosana.

2.9.1- Obtención y características de la Quitosana.

Los hidrolizados de Quitosanas según Hadwiger (1999), se obtienen por degradación del polímero empleando en dos métodos: químico y enzimático.

1. Se basa en el empleo de agentes químicos tales como: ácido clorhídrico, ácido nitroso y ácido fosfórico, entre otros reactivos para hidrolizar la Quitosana (Domard, 1999), aunque en ocasiones, estos provocan contaminación en los productos obtenidos, así como la des acetilación de los mismos.
2. Emplear enzimas con actividad quitosanasasa para degradar la Quitosana y posee una mayor efectividad en la hidrólisis enzimática, a garantizar un mejor control del curso de la reacción y distribución de los productos (Muzzarelli, 2000), este método inicialmente se subrayó en su empleo a gran escala, debido al alto costo de las enzimas puras, lo cual encarecía la obtención de los productos de degradación del Quitosana.

No y Meyer (1995) plantean que la Quitosana es un biopolímero lineal que se obtiene por des acetilación alcalina de la quitina. Esta sustancia ha ganado el interés de muchos investigadores por su doble cualidad de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (No *et al.*, 2002) y de estimular mecanismos de defensa en las plantas (Benhamou, 1996), los cuales pueden conferirles resistencia contra el ataque de enfermedades. Las propiedades de la Quitosana unido a su carácter renovable y biocompatible, lo convierte en un sustituto ideal para la sustitución de los actuales plaguicidas modernos (Hirano, 1997). Sin embargo, la actividad biológica de este bioestimulante y sus derivados depende mucho de sus estructuras y características químicas; en este sentido, las propiedades de ella sobre el grado de acetilación y la masa molecular son las que más influyen en el comportamiento químico y biológico de estas sustancias (Majesti *et al.*, 2001).

Yalpani y Pantaleone (1994); Muzzarelli (1994); Terbojevich (1996) y Shin-Ya (1998), empleando enzimas comerciales baratas como pectinasas, celulasas, hemicelulasas, en la degradación de Quitosanas, demostraron que esta se realizaba de una manera

muy efectiva cuando se emplean enzimas altamente específicas, lo cual constituyó un paso de avance en la obtención de hidrolizados de Quitosana de un modo barato y asequible. Sin embargo, ha sido difícil lograr hidrolizados de Quitosana enriquecidos en oligómeros de grado de polimerización mayores que seis, se consideran que los de mayor actividad biológica (Aiba, 1998; Shibuya y Minami, 2001), el empleo de productos bioactivos como los hidrolizados de Quitosana en la agricultura contribuirá a disminuir los gastos destinados a la compra de agentes fitosanitarios y evitará una mayor contaminación del medio ambiente garantizándose a la vez una dieta más sana al hombre (Messiaen, 1994).

El proceso de obtención de la Quitosana (Rinaudo y Domard, 1983), mencionan que consiste en una serie de lavados alcalinos o ácido con suficiente agua, existen dos factores principales que determinan la calidad de Quitosana: **1^{er}** factor es el grado de desacetilación, el cual está determinado por el número de pasos involucrados en la hidrólisis, la primera hidrólisis proporciona una desacetilación cerca del 80%, la segunda cerca del 95% y una tercera cerca del 98%, entre mayor la desacetilación es mejor la calidad. **2^{do}** factor es la viscosidad estándar.

La quitina fue encontrada por la primera vez en el año 1811 por el profesor Henri Braconnot en hongos. En 1830 se aisló en insectos y se le dio el nombre de la quitina. El descubrimiento de la Quitosana en 1859 por C. Rouget supuso el inicio de una investigación intensa sobre este compuesto. Falcón *et al.*, (2004), planteó que la quitina es un polímero de la N-acetilglucosamina y residuos de glucosalina que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza de tal forma que constituye el segundo polímero más abundante después de la celulosa.

La quitina es un polisacárido no tóxico y biodegradable que forma una sustancia córnea y es el principal constituyente del exoesqueleto de insectos, crustáceos y arácnidos. Los residuos de procesados de mariscos contienen en general un 14-35% de quitina asociada con proteínas de 30-40%, lípidos, pigmentos y depósitos de calcio de 30-50% estimándose, una producción mundial anual de quitina en los residuos de 120.000 toneladas (Falcón *et al.*, 2004). Por otro lado, Quitosana es la forma de N-desacetilada de la quitina que se obtiene tras sustituir grupos acetamidas

por grupos aminos, forma parte de la pared corporal de la mayoría de los hongos, levaduras y mohos, se biodegrada en el hombre por la acción de la lisozima.

La Quitosana seca en polvo no tiene punto de fusión definido, es un sólido amorfo de color blanco, insoluble en agua, álcalis y solventes orgánicos comunes (alcoholes), pero es soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos como: acético, fórmico, cítrico, glicólico, láctico (Rinaudo y Domard, 1983), la solubilidad y viscosidad de la Quitosana depende del grado de desacetilación y degradación del polímero, puede verse incrementada por la adición de forma aldehído, cloruros de acilo, anhídridos de ácidos o sales de metales alcalinos, debido al entrecruzamiento de cadenas que da lugar a un polímero de mayor peso molecular; estas soluciones acuosas resultantes no pueden ser dispersadas ni disueltas por adición de agua (Nakamatsu y Da Silva, 1998).

Larez (2006) propone un esquema simplificado para la obtención de quitina y quitosana a partir de conchas de crustáceos, (**Figura 2**).

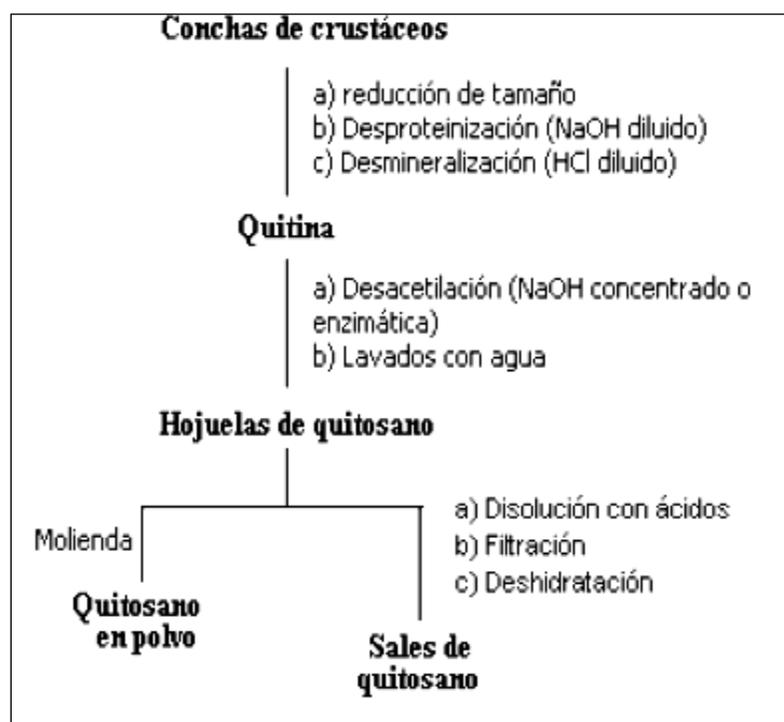


Figura 2.- Esquema simplificado para la obtención de quitina y quitosana a partir de conchas de crustáceos.

2.9.2- Aplicaciones de la Quitosana.

2.9.2.1-Tratamientos de agua.

Actúa como removedores de iones metálicos, como quelantes de metales de transmisión, contaminantes ambientales, floculantes, coagulantes y precipitantes de proteínas, aminoácidos, tintes, colorantes, algas, aceites, metales radioactivos, partículas en suspensión y pesticidas.

2.9.2.2- Biotecnología.

Actúa en la inmovilización de enzimas, separación de proteínas, inmovilizar celular, reacción con aldehídos, captación de células y enzimas.

2.9.2.3- Agricultura.

Actúa como un bioestimulante de plantas en tratamientos de semillas, raíces, hojas y en tratamientos post-cosecha de frutos y verduras con el fin aumentar su conservación (Carhuapoma y Santiago, 2005), recubrimientos de semillas, conservación de frutos, protección frente a plagas y hongos, virucida y estimulante del crecimiento de las plantas. La quitosana es un polímero que ha sido ampliamente estudiado en los últimos años conjuntamente con su precursor natural, debido a la gran variedad de aplicación que presenta, una de las propiedades de este bioestimulante es que ha sido objeto de la investigación con mayor intensidad es, que este producto tiene doble propósito:

- En 1^{er} lugar, inhibe el crecimiento micelar de una amplia variedad de hongos fitopatógenos e inducir el mecanismo defensivo entre ello, la síntesis de compuestos de bajo peso molecular como las flialexinas, síntesis de celulosa, lignifica, estimulación de la actividad de las enzimas fenilalanina, amonioleasa (PAL) gluconasa que provoca la resistencia de los cultivos tales como el tomate y pepino.
- En 2^{do} lugar, esta sustancia cuando se aplica al inicio de la floración a los cultivos es capaz de estimular su crecimiento tanto en tallos, hojas y el tamaño de los frutos y aumentar los rendimientos de los cultivos al compararlos con las plantas que no se le aplicó esta sustancia (Cabrera, 1999).

La quitosana como un polisacárido catiónico de alto peso molecular definido a partir de la quitina desacetilada ha demostrado la actividad anti-fúngica contra varios hongos (Benhamou, 1996), cuando la quitosana es asperjado en las hojas de varias especies vegetales induce resistencia local y sistémica contra infecciones causadas por varios virus como el virus del mosaico de la alfalfa y el virus del mosaico del tabaco (Pospieszny *et al.*, 1991), además, este polímero protege a las plantas como: tomate, pepino, guisante, melón, fresa y lechuga contra el mildium y otras enfermedades (Bhaskarareddy *et al.*, 1999). No obstante, es conocido que la actividad elicitora de estos compuestos depende del grado de des acetilación de la molécula y de la masa molecular del polímero (Vander *et al.*, 1998).

En términos generales, la aplicación del quitosana ha mostrado efectos positivos en el crecimiento de las plantas, tanto en la estimulación de la germinación de semillas como en el crecimiento de partes de la planta como raíces, retoños y hojas. En algunos casos, se ha observado que la estimulación de la germinación de semillas por tratamiento con quitosana ha logrado elevar el porcentaje de germinación a los niveles requeridos para la certificación (Bhaskara *et al.*, 1999).

Los efectos beneficiosos de la quitosana se han observado en plantas florales (Wanichpongpan *et al.*, 2001) y en plantas de cosecha (Chibu y Shibayama, 2001). Así, por ejemplo, cuando se aplicaron soluciones muy diluidas de quitosana en las raíces de orquídeas, en forma de aerosol, éstas mostraron una estimulación en su crecimiento y renovaron su producción de flores (Chandrkrachang, 2002), entre otros efectos favorables. Un estudio más reciente, relacionado con el crecimiento de tejidos vegetales, ha mostrado que el origen de la quitosana es un aspecto importante.

Las Quitosanas procedentes de hongos necesitaron de dosis menores para la inducción de la diferenciación de tejidos de plantas de orquídeas que los oligómeros procedentes de caparzones de camarones (Nge *et al.*, 2006), lo cual no es del todo extraño. A este respecto se sabe que uno de los aspectos fundamentales en las propiedades fisicoquímicas del quitosana es su fuente de extracción. Así por ejemplo, la quitina obtenida de camarones y cangrejos tiene una estructura

cristalográfica, en la cual las cadenas principales están ordenadas en agregados anti paralelos que les permite formar puentes de hidrógenos intermoleculares muy fuertes, mientras que la procedente de las plumas de calamar tiene una estructura, con las cadenas ordenadas en arreglos paralelos y fuerzas intermoleculares más débiles (Tolaimate *et al.*, 2000).

El uso de quitosana para el recubrimiento de frutas y vegetales se ha propuesto y ensayado desde hace más de 15 años (El Ghaouth *et al.*, 1991) debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, su capacidad para formar películas y su baja toxicidad en seres humanos, la cual había sido estudiada en la década de los sesenta del siglo pasado (Arai *et al.*, 1968). En principio, la capacidad del quitosana para formar películas favorece la preservación de los productos debido a la modificación de la atmósfera interna y a la disminución de las pérdidas por transpiración. En la mayoría de los sistemas estudiados se observó un efecto positivo en la conservación de los productos después de su recubrimiento con quitosana. Así por ejemplo, Devlieghere *et al.*, (2004) observaron que el recubrimiento de fresas con soluciones de quitosana tiene efectos benéficos notables a partir del cuarto día, en la preservación del fruto. Las principales observaciones en estos sistemas han sido las siguientes:

- ❖ Disminución en las pérdidas por transpiración. La respiración disminuye lentamente, aunque inicialmente se observa un incremento de la misma que se atribuye al estrés ocasionado por la solución acuosa de ácido láctico/lactato de sodio usada para disolver el quitosana.
- ❖ Se conserva una mejor textura con el tiempo; en los casos donde se realizaron mediciones cuantitativas se estableció una mayor firmeza en los frutos tratados con quitosana que en aquellos no tratados.
- ❖ Aparte de un ligero sabor amargo inicial durante el primer día, que desaparece rápidamente y que no se aprecia en días posteriores, la presencia de quitosana no causó diferencias organolépticas apreciables entre los frutos tratados y los frutos no tratados con quitosana.

- ❖ La carga microbiológica a lo largo del tiempo permaneció siempre más baja en los sistemas tratados con quitosana.

En este mismo trabajo se reportaron resultados similares para una mezcla de legumbres frescas (lechuga, endibia, rábano, etc.) tratados sin embargo, en este caso se observaron dos situaciones iniciales adversas:

- ❖ El sabor amargo inicial de las muestras tratadas con quitosana permanece durante un tiempo mayor, aunque éste va desapareciendo en el tiempo. Se atribuyó este sabor amargo al pH inicial más alto de la solución de quitosana (alrededor de 5) ya que las soluciones de quitosana con $\text{pH} < 5,5$ tienen un sabor astringente que se hace menos pronunciado a medida que el pH aumenta (Rodríguez *et al.*, 2003)
- ❖ Una apariencia limosa inicial de las legumbres, que va tornándose con el tiempo similar a la de las muestras control.

La carga microbiológica en la mezcla de lechugas comienza a aumentar a partir del cuarto día; los autores asumen que la actividad bactericida de la solución de quitosana usada en estos ensayos es menor debido a que el pH alto (5) lo hace tener una menor fracción de cargas positivas.

Los aspectos que deben ser considerados en la preservación de frutos y vegetales mediante el uso de recubrimientos de quitosana son:

- a) El tipo de quitosana a emplear (grado de acetilación, peso molecular, procedencia).
- b) Ácido usado para preparar las soluciones acuosas.
- c) pH del medio, cuidando de respetar el pH natural del producto a proteger.
- d) Temperatura de almacenamiento.
- e) La presencia de otros componentes en el producto a proteger, como por ejemplo azúcares, sales, proteínas, etc.

III- MATERIALES Y MÉTODOS.

El trabajo se desarrolló en las áreas de semillero del productor Arturo Aguilar Peña, perteneciente a la Cooperativa de Créditos y Servicios Fortalecida “José Arteaga”, ubicada en el poblado de Macuto, Veguita, Yara de la provincia de Granma, durante el periodo comprendido del 26 de Octubre al 15 de Diciembre del 2011.

3.1- Montaje de la investigación.

La investigación se desarrolló en condiciones de canteros a campo abierto, contruidos con tejas y fibrocemento, con una dimensión de 18 m de largo x 1,20 m de ancho, para un área total por cantero de 21,6m².

El sustrato que contenían los canteros estaban compuestos por un 70% de materia orgánica bien descompuesta, proveniente de estiércol vacuno y 30% de suelo, de tipo fluvisol (Hernández *et al.*, 1999), adecuadamente mezclados.

3.2- Realización de la siembra.

Luego de lograda la homogeneidad necesaria en la preparación de los canteros, se procedió a la realización de la siembra, utilizando semillas de tabaco de la variedad “Habana-92”, las cuales provenían de la Empresa de Semillas de Bayamo, aunque no mostraron un porcentaje de germinación adecuado, teniendo que incrementar la norma de siembra. La siembra se realizó al voleo, empleando una norma de 0,20g/m². Para lograr una distribución uniforme de la semilla en el cantero, se mezcló la semilla con fertilizante mineral, tratando de cubrirse toda el área del cantero en el momento de esparcirse la semilla sobre este y así evitar áreas vacías en el cantero.

Previo a la siembra se realizó un riego ligero, para homogeneizar el suelo, incrementando la norma luego de realizada la siembra, para ello se empleó un sistema de riego por aspersión.

Después de realizar la siembra en todos los canteros, se procedió a cubrir la superficie del suelo del cantero con pajón en estado seco y de esta forma favorecer el mantenimiento de la humedad de la superficie del cantero, con el objetivo de incrementar el porcentaje de germinación de la semilla.

3.3- Atenciones al semillero.

Desde la siembra hasta la germinación de la semilla, que ocurrió a partir de los 6 días, el riego se efectuó 2 veces al día, en horarios de la mañana y la tarde para garantizar un adecuado nivel de humedad en el cantero que permitiera la germinación de la semilla. Posterior a la ocurrencia de esta, el riego se continuó realizando una vez al día, preferentemente en horario de la mañana. Se realizó de manera sistemática la eliminación de las plantas indeseables que fueron germinando, manteniendo un cuidado extremo para no dañar las pequeñas plántulas de Tabaco ya germinadas.

3.4- Tratamientos evaluados.

Tratamiento 1: Control (sin aplicación de Quitosana).

Tratamiento 2: Quitosana - 300 mg/ha.

Tratamiento 3: Quitosana - 350 mg/ha.

3.5- Diseño experimental

Se siguió un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos, descritos anteriormente, y tres repeticiones por tratamiento. El área total por tratamiento fue de 64,8 m² y 194,4 m² de área total.

3.6- Aplicación de la Quitosana.

La quitosana se aplicó en dos momentos, a los 10 y 25 días después de la germinación, empleando para ello una bomba mochila Matabi de 16 Litros de capacidad, según las dosis anteriormente descritas.

3.7- Evaluaciones realizadas.

En el momento del trasplante, a los 45 días de establecidas las plantas en condiciones de semillero se evaluaron las variables siguientes, en 20 plantas por tratamiento:

- Altura de las plantas (cm): Se midió desde la parte basal hasta el ápice del tallo, empleando una regla graduada de 30cm.

- La anchura de las hojas (cm): Fue determinada a partir de la selección de la tercera hoja, 20 plantas por tratamiento. Se determinó por la parte media de la hoja con una regla graduada de 30 cm.
- La longitud de las hojas (cm), se evaluó desde el punto de inserción de la hoja en el tallo hasta el ápice, en las mismas hojas seleccionadas para el indicador anterior, empleando una regla graduada de 30 cm.
- El diámetro del tallo (mm), para su medición se utilizó un Pie de Rey, registrando los valores obtenidos de la parte basal de las plantas.
- Número de hojas, se determinó por conteo en las plantas seleccionadas por tratamiento.
- Número de raíces: Se determinó por conteo en las plantas seleccionadas por tratamiento.
- Masa fresca de la parte aérea (g): Se seleccionó una muestra de 15 plantas por tratamiento. El pesaje se realizó en una balanza electrónica Sartorius.
- Masa seca de la parte aérea (g): Se determinó colocando las plantas seleccionadas en una estufa a 70 °C, durante un tiempo de 2h para provocar la muerte de los tejidos. Posteriormente se reguló la temperatura a 120°C. Con una frecuencia de 2h se fue realizando el pesaje de la muestra hasta alcanzar peso constante.
- Masa fresca de la raíz (g): Se seleccionó una muestra de 15 plantas por tratamiento. El pesaje se realizó en una balanza electrónica Sartorius.
- Masa seca de la raíz (g): Se siguió el mismo procedimiento que para la parte aérea.

3.8- Análisis Estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos obtenidos se empleó un análisis de varianza de clasificación simple, mediante el paquete estadístico STATISTICA, versión 6.0 sobre WINDOWS 2000 y se empleó la prueba de comparación múltiple

de media de Tukey, para un nivel de significación del 5 %, cuando se encontró diferencia entre las medias de los tratamientos.

3.9- Valoración económica:

La valoración económica se realizó sobre la base de determinar, a través de un muestreo, en un área de 1m², en tres puntos por cada tratamiento, la cantidad de posturas producidas, en el momento de trasplante. Se determinó la cantidad de posturas producidas en el área de investigación y posteriormente se calculó las posturas que se pueden producir en 1 ha de semillero, teniendo en cuenta los resultados logrados. Se utilizó la metodología de la FAO (1980), teniendo en cuenta los indicadores siguientes:

Vp (\$).-Valor de la producción.

Producción de posturas obtenidas en 1 ha de semillero, por el precio oficial de venta del millar de posturas en la CCS.

VAP (\$).-Valor agregado de la producción: Vp de los tratamientos con quitosana – Vp de control.

B (\$).- Beneficio.

B= VAP de los tratamientos/ VAP del control

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al valorar los resultados obtenidos y compararlo con otros trabajos realizados sobre la temática tratada podemos proponer lo siguiente:

El comportamiento del variable número de hojas es diferente en los tres tratamientos evaluados (**Figura 3**), ver anexo. El empleo del bioestimulante provocó un incremento significativo del número de hojas, con un valor significativamente superior cuando se empleó la mayor dosis de quitosana (T3) (**Figura 4**), ver anexo. Lográndose 6.88 hojas por planta, superior estadísticamente a los tratamientos donde se emplea $300\text{mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de quitosana (T2) y al control (T1) con 5,08 y 4,66 hojas por planta, respectivamente. Se aprecia una tendencia al incremento del número de hojas con el incremento de la dosis de quitosana.

Estos resultados pudieron haber sido causados por el papel demostrado de la quitosana en la regulación y expresión de genes esenciales para el crecimiento y desarrollo del vegetal lo cual redundaría en su posible uso como regulador de la germinación, el crecimiento y la productividad de los cultivos (Freepons, 1990; Aldington *et al.*, 1991).

Resultados recientes del Grupo de Productos Bioactivos del Inca (GPB), en un PNCT en curso, corroboran el papel de estas macromoléculas en las funciones de la planta y establecen su potencial uso como aditivos de productos agrícolas (Costales *et al.*, 2005; 2007).

4.2- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en la longitud de la hoja en el momento de trasplante.

Con relación a la longitud de la hoja (**Figura 5**), ver anexo, el empleo del bioestimulante provocó los mayores valores en relación con el control, siendo significativamente superior cuando se empleó una dosis de $350\text{mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (T3), con 13,85 cm, con diferencia significativa respecto al empleo de $300\text{mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (T2) y al control (T1), con 11,71 y 10,18 cm, respectivamente.

La respuesta del cultivo a la aplicación de quitosana pudiera estar relacionada con su influencia en la actividad enzimática, relacionado con la acumulación de quitinasas,

b-1,3-glucanasa, síntesis de fitoalexinas (Bhaskarareddy *et al.*, 1997, 1999; Zhang and Quantick, 1998).

4.3- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el ancho de la hoja en el momento de trasplante.

El ancho de la hoja (**Figura 6, Figura 7**), ver anexo, también se vió estimulado con el empleo del bioestimulante, lográndose los mayores valores, siendo significativamente superior cuando se empleó una dosis de 350 mg.ha⁻¹(T3), con 10,31 cm, con diferencia significativa respecto al empleo de 300 mg.ha⁻¹(T2) y al control (T1), que alcanzaron valores de 8,42 y 6,84cm, respectivamente.

4.4- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en la altura de las plantas en el momento de trasplante.

Con relación a la altura de las plantas se aprecia un comportamiento similar a la variable anteriormente evaluada (**Figura 8**), ver anexo, donde el empleo del bioestimulante provocó los mayores valores en relación con el control, aunque fue superior cuando se empleó una dosis de 350 mg.ha⁻¹(T3), con 8,34 cm, con diferencia significativa respecto al empleo de 300 mg.ha⁻¹(T2) y al control (T1), con 5,52cm y 4,27cm, respectivamente. La utilización de la mayor dosis del producto tuvo un efecto estimulante en el incremento de la altura de las plantas; lo que puede estar dado en gran medida por la composición de este. En cuanto a los efectos en el crecimiento, Sharathchandra *et al.*, (2004), obtuvieron resultados favorables con el empleo de quitosana, estimulando el vigor de las plántulas.

Con estos resultados se demuestra la acción benéfica de la bioestimulación, lo que significa un incremento importante en la producción de los cultivos, en nuestro caso el tabaco, donde es importante la obtención de posturas de calidad para garantizar adecuados rendimientos en la cosecha de las hojas, fruto útil en este cultivo. Reportes sobre el efecto de los bioestimulantes, que reafirman la importancia de estos en las plantas, en el comportamiento de esta variable, fueron realizados en el por Díaz (1995), al aplicar Biobras-16, Cuellar (2001) al aplicar Biostan y en el Oriente, Mariñas (2004) y Enamorado (2006) al aplicar Biobras-16, de composición diferente, pero en muchos casos con efectos similares.

Otros autores como Cabrera (1999); Karlova y Vries (2006) han expresado que los bioestimulantes son capaces de estimular el crecimiento, tanto en los tallos, hojas, como en el tamaño de los frutos, y de esta manera incrementar el rendimiento del cultivo donde se aplican, al compararse con las plantas donde no se aplica.

4.5- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el diámetro del tallo en el momento de trasplante.

Se puede apreciar que hubo una incidencia positiva del bioestimulante sobre el diámetro del tallo (**Figura 9**), ver anexo, encontrándose el mayor diámetro (6,45mm) cuando se empleó una dosis de 350 mg.ha⁻¹ (**Figura 10**), ver anexo, seguido por el tratamiento donde se aplicó 300 mg.ha⁻¹ de quitosana, con diferencia significativa entre ellos y con relación al control (T1), donde se obtuvo el valor más bajo (4,47mm). Esta incidencia positiva fue reportada por Falcón (2007).

Resultados similares fueron reportados por Beltrán (2007), en la zona de Jiguaní pero con dosis menores a las probadas por nosotros y los valores obtenidos a pesar de que superaron al testigo, están por debajo de los obtenidos en la presente investigación.

El tabaco es un cultivo que responde favorablemente a la aplicación de los bioestimulantes, según resultados reportados por Beltrán (2007) con Quitosana quien reporta incrementos de esta variable, lo que coincide con nuestros resultados.

De forma general la aplicación de quitosana estimuló el crecimiento de las posturas de tabaco durante la fase de semillero, lográndose un mayor desarrollo de las mismas en comparación con el control (**Figura 11**), ver anexo.

Los resultados obtenidos en la producción de posturas, donde se experimenta un mayor crecimiento, tanto de la masa foliar como radical, se debe en gran medida a la actividad biológica de la quitosana, la cual ha sido determinada utilizando la inducción de reacciones de defensa en la planta y ensayos de regulación del crecimiento (Falcón *et al.*, 1995; Falcón *et al.*, 2005, 2007, Falcón y Cabrera, 2007). Algunas de estas moléculas activas han sido introducidas en las prácticas agrícolas de productores locales (Gutiérrez *et al.*, 1998; Cabrera *et al.*, 2003; Izquierdo *et al.*, 2006, 2009).

La aplicación de quitosana ejerció un efecto significativo en el incremento de la masa fresca y seca, tanto de la parte aérea como de la raíz (**Tabla 1**), ver anexo. Con excepción de la masa fresca de la raíz, que no presentó diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, en el resto de las variables evaluadas, los mejores resultados se encontraron cuando se aplicó 350 mg.ha⁻¹ de quitosana (T3), con diferencia significativa con los tratamientos donde se aplicó 300 mg.ha⁻¹ de quitosana (T2) y el control (T1), donde se obtuvieron los resultados inferiores.

4.6- Influencia de la aplicación de quitosana en el comportamiento de la masa fresca y seca de la parte aérea y raíz.

Reportes de la incidencia de este bioestimulante fueron realizados por Rodríguez (2008). Con relación a la masa seca muchos autores han reportado la incidencia positiva de este y otros bioestimulantes como Falcón (2004), Beltrán (2007); Rodríguez (2008), al evaluar diferentes dosis de quitosana en esta variedad. Otros autores como Quintana (2007) en maíz, Beltrán (2007) y Rodríguez (2008) en tabaco, demostraron los efectos positivos de la quitosana sobre los rendimientos en estos cultivos.

Los efectos de la quitosana en las variables evaluadas anteriormente pudieran estar dados una parte por los mecanismos defensivos desarrollados en la planta, al liberarse estructuras de la pared celular de la planta en el proceso de patogénesis. Estos mecanismos defensivos pueden ser estimulados por poli y oligosacáridos de origen microbiano o de la planta, que en general actúan como activadores de resistencia sistémica inducida (RSI) en la planta contra patógenos (Kúc, 2000; Agrios, 2005). Por todo lo anterior, varias oligosacarinas constituyen en la actualidad principios activos de productos para la protección de los cultivos (Klarzynski y Fritig, 2001; Sharathchandra *et al.*, 2004).

La quitosana ha sido aplicada en otros cultivos como *Eustoma grandiflorum* (*Lisianthus*), donde ha acelerado el periodo de floración e incrementado la masa y el número de flores; así como el peso fresco y masa seca con relación a las plantas no tratadas (Ohta *et al.*, 1999; Bautista-Baños, 2006).

Pérez *et al.* (2000), encontraron incrementos de aproximadamente un 30% de la masa fresca de los frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedad Amalia, sin afectar la calidad interna de los mismos, al aplicar Biobras-16 a razón de 40 ml.ha⁻¹.

Varios autores señalaron la incidencia de las sustancias estimulantes del crecimiento en el desarrollo y la calidad del fruto agrícola, entre los cuales podemos citar a Núñez (1997 y 2004); Terrero (2007) en el cultivo del pepino. Otros investigadores que han aplicado algunos bioestimulantes a este cultivo han reportado beneficios para el productor como Beltrán (2007) con Quitosana; Naranjo (2006) con Pectimorf, Enamorado (2006) con Biobras-16 y Cuellar (2001) con Biostan y Agrispon por lo que todos estamos de acuerdo que el cultivo responde a la aplicación exógena de bioestimulantes y que pudiera incluirse en la tecnología de explotación de la variedad Habana'92 la aplicación de Quitosana.

4.7- Valoración Económica.

La realización del muestreo en un área de 1 m², en cinco puntos por cada tratamiento arrojó como resultado una producción de posturas diferente en cada uno de los tratamientos, con los resultados siguientes:

- Tratamiento 1: 295 posturas
- Tratamiento 2: 322 posturas
- Tratamiento 3: 340 posturas

A partir de estos resultados se determinó el total de posturas que se producen en una ha de semillero, con lo cual, a partir del precio de venta establecido en la entidad para la venta de las mismas se determinó el valor de la producción.

Los resultados obtenidos de acuerdo al precio actual de venta de posturas de tabaco en las condiciones productivas evaluadas, reflejan que es muy atractiva la producción de este cultivo para los productores con la aplicación de quitosana como producto bioestimulante (**Tabla 2**), ver anexo.

Con la aplicación de la quitosana se logra un incremento significativo del valor de la producción, siendo superior cuando se utiliza la mayor dosis (T3) con 85 0004. El valor agregado de la producción que se obtiene es significativo, proporcionando un

beneficio neto alto al productor debido a la acción beneficiosa de este producto sobre el cultivo, lo que puede proporcionar una variante factible de ser aplicada dentro de la tecnología de producción del cultivo de tabaco, específicamente para la producción de posturas.

V- Conclusiones.

- 1- El empleo del bioestimulante quitosana, constituye una alternativa favorable en la producción de posturas de tabaco, mejorando significativamente la calidad de las mismas.
- 2- Con el empleo de 350 mg.ha^{-1} de quitosana se lograron los mejores resultados en todas las variables evaluadas, resultando una práctica atractiva.
- 3- Con el empleo de quitosana para la producción de posturas de tabaco se obtienen incrementos significativos en los indicadores económicos, contribuyendo a mejorar los ingresos de la entidad.

VI- Recomendaciones.

- 1- Emplear la quitosana como bioestimulante de uso agrícola para la producción de posturas de tabaco, especialmente empleando una dosis de 350 mg.ha^{-1} , en condiciones similares a las evaluadas.
- 2- Evaluar el bioestimulante aplicado en otras variedades de interés en los planes productivos y hacerlo extensivo a otras áreas tabacaleras del territorio.

VII- Bibliografía.

- Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. 5th ed. Academic Press, New York, USA.
- Akehurst, B. C. (1973): El Tabaco. Agricultura tropical. Ed. Labor, S. A. La Habana. 682 p.
- Aiba, S. (1998). Cellulase degradation of shrimp chitosan for the preparation of a water-soluble hydrolysate with immunoactivity. *Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 320. 31077-31082p.
- Aldington, S., Mcdougall, G.J., Fry, S.C. (1991). Structure-Activity relationships of biologically active oligosaccharides. *Plant, Cell and Environment* 14: 625-636.
- Altieri, M. A. (1997): Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable. CLADES. ACAO. La Habana, 249 p.
- Aragón, A. (1994): Fundamentos de Agronomía. Ed. Pueblo y Educación. La Habana, Cuba, 313 p.
- Arenas, B. (1998). Mercado del puro. El habano único insustituible de cara al III milenio. *Revista Trips on Cuba*. Vol.5 No.7 pp. 24-25.
- Ares, D. M., H. García, S. Naranjo, I. Peláez. (1999): Caracterización parcial de las fracciones proteicas extraídas de las hojas de tabaco. *CUBATABACO*. 1 (1): 56.
- Arias, G.F; Puebla, A.M y R. García. (2000). Comportamiento de tres variedades de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) ante diferentes distancias entre plantas en un suelo fluvisol de la provincia Granma. Trabajo de Diploma. Universidad de Granma.p.10.
- Arai K.; T. Kinumaki and T. Fujita. (1968). Toxicity of chitosan. *Bulletin of the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory* 56: 89–92.
- Bautista-Baños, S. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25 (2006) 108–118 Review.

- Beltrán, Yoanner. (2007). Evaluación de tres dosis de quitosana en el cultivo del tabaco, variedad H-92. Trabajo de Diploma. Universidad de Granma.
- Benhamou, N. 1996. Elicitor-induced plant defense pathway. Trends in Plant Science 7: 233-240.
- Bhaskarareddy, M., Anil, J., Angers, P. y Couture, L. (1997). Chitosan treatment of wheat suds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. J. Agric. Food Chem. 47. 1208-1216 p.
- Bhaskarareddy, M., Anil, J., Angers, P. y Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat suds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. J. Agric. Food Chem. 47. 1208-1216 p.
- Bhaskara, M. V.; J. Arul, P. Angers and L. Couture.(1999). Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to *Fusarium graminearum* and Improves Seed Quality. Journal of Agriculture and Food Chemistry 47: 208–1216.
- Cabrera; Corllete. C. (1999). Obtención de oligogalacturomidos bioactivos apartir de mbproductos de la industrial criticota. Tesis de Doctorado. INCA. UNAH.
- Cabrera, J.C.; Iglesias, R.; Gutiérrez, A.; Hormaza, Josefa; González, S., Diosdado, Esther Y Gómez, R. (2003). Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécticos estimuladora del enraízamiento vegetal. *Patente Cubana* № 22859/2003.
- Chandrkrachang, S. (2002). The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. In: K. Suchiva, S. Chandkrachang, P. Methacanon and M.G. Peter, Editors. Advances in Chitin Science, 5, 458–462. ISBN 974-229-412-7.
- Carhuapoma, W y Santiago, J. (2005). Una Revista Iberoamericana de Polímeros. Hidrogeles de Quitosana-Alcohol polivinílico. Vol. 6 (4).
- Castro, F.(2001).La Revolución más unida y más fuerte. Acto de inicio de curso escolar 2001-2002. Palacio de las Convenciones. Periódico Granma. Ciudad de la Habana.7/sep.2001 p 1.

- Costales, D., Nápoles, M.C., Falcón, A.B.. (2005). Efecto de derivados de Quitosana en la simbiosis *Bradyrhizobium*-soya. *Cultivos Tropicales*, vol. 26 (1): 83-87.
- Cuellar, Anayansy. (2001). Efecto del Agrispon como bioestimulador del crecimiento en el rendimiento y calidad del tabaco tapado. *Rev. CUBATABACO*. 2 (1):9-13p.
- Cuellar, I. A. (2001): Residuos de la industria Azucarera. *Cuba azúcar*. XXXI (2): 16.
- Devlieghere, F.; A. Vermeulen and J. Debevere.(2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21: 703–714.
- Díaz, G. (1995). En la efecto de un análogo de brasinoesteroide DDA-6 en el cultivo del tabaco. *Cultivos Tropicales*. La Habana. 16(3). 53-55p.
- Díaz, M. *et al.* (1997): Efecto de diferentes fuentes de fertilización en el rendimiento y calidad del tabaco negro (Capero) en Cuba. Instituto de Investigaciones del tabaco. La Habana. Cuba.
- Durán, J. L. (1998): Degradación y manejo ecológico de los suelos tropicales, con énfasis en los de cuba. *Agric. Org.* 4 (1): 7- 8.
- El Ghaouth, A.; J. Arul, R. Ponnampalam and M. Boulet.(1991). Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science* 56: 1618–31.
- Elliot, J. M. (1970): The effect of topping hight and spacing on yield grade and some physical caracterics of bright tobacco, (21): 67 – 71.
- Enamorado, Osleidi. (2006). Evaluación del Biobras-16 aplicado a los 10 días después del trasplante en la variedad de tabaco SS-96. Trabajo de Diploma. Universidad de Granma.

- Espino, E. M. (1997): Cuban cigar.Tobacco. Why Cuban Cigars are the worlds best. Manufactured in the United States of America by T.F.H. publications, INC.
- Espino, E, M. (1998). Origen y características de las principales variedades cubanas de tabaco negro (*Nicotina Tabacum* L). Instructivo de Investigaciones del Tabaco. La Habana. Cuba, p.4 – 5.
- Falcón, A; Cabrera, J.C.; Paz-Lago, D. & Gutiérrez, A. (1995). Interacción oligosacarinas-planta I. La aspersion foliar de oligosacáridos de pared celular de planta induce la síntesis y acumulación de inhibidores de proteinasas en tomate Cultivos Tropicales, 16 (3) : 25-28-
- Falcón, A. (2004). Informe del proyecto. Evaluación de la quitosana en cultivos de interés agrícola. INCA. La Habana.
- Falcón. A; Cabrera, J.C (2004). Evalaution of chitosan as an inhibitor of soil-borne pathogens and as an elicitor of defence markers and resistance in tobacco plants. (INIA).
- Falcón, AB., Cabrera, JC., Reinaldo, IM. y Nuñez, MN. (2005). Desarrollo de activadores de las plantas de amplio espectro de acción. *Informe Final del PNCT 00100191*, CITMA.
- Falcón, A.B. (2007-2009). PNCT, código: 00300277. Evaluación de Oligosacarinas nacionales de quitosana en la estimulación del crecimiento, la nodulación y la protección de cultivos de interés económico.
- Falcón, A.B., Cabrera, J.C. (2007) Actividad enraizadora de una mezcla de oligogalacturónidos en pecíolos de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). Cultivos Tropicales, Vol. 28 (2): 87-90.
- FAO. (2004). Formación de profesionales para el desarrollo agropecuario sostenible.-Santiago de Chile:(s.n),1993.__14.
- Freepons, D. (1990). Plant growth regulators derived from chitin. *US Patent 4964894*.

- Galantini, Juan A., María R. Landriscini y Rodrigo Fernández. (2004). Materia Orgánica y Nutrientes en Suelos del Sur Bonaerense. Relación con la textura y los sistemas de producción. Dpto. Agronomía -UNS, 8000 Bahía Blanca. <http://www.infoagro.com/buscador/buscador.asp>
- García, Milagros; M. Marín; E Corona (1985). Dinámica de crecimiento en hojas de Tabaco Variedad Corojo. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Tabaco. Vol 8.No2 p45.
- García, H. (1989): "Más que fumar ". Cubataco. (71): 52 – 55.
- Gardón, D. (2005). Profesor Titular de la UDG. Comunicación personal.
- Gómez, Laura. (1998). Desafíos de la agricultura orgánica. Comercialización y certificación, CIESTAAM, Universidad de Chapingo, p. 31.
- Gómez JC. (2011). TABACO DE ECUADOR CON FAMA MUNDIAL. EN: <http://www.eluniverso.com/2002/09/07/0001/71/7FEC4F3452A24F148ED2E1BC17068330.html>. Guayaquil, Ecuador.
- Guerra, J. G., N. Rodríguez, L. Díaz y B. Zulueta. (1999): La influencia de la distancia entre plantas en algunos índices biológicos y físicos de la variedad de tabaco negro "Habana 2000" p 17.
- Gutiérrez, A.; Nápoles, María C. & Cabrera, J.C. (1998). Oligosacarinas: Antecedentes y aplicaciones en la agricultura cubana *Ediciones INCA*, ISBN: 959-7023-08-3.
- Hadwiger, L. A.; D. F. Kendra, B. W. Fristensky and W. Wagoner.(1999). Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. *In: Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C., Gooday, G.W. (Eds.), Chitin in Nature and Technology. Plenum Press, New York, pp. 209–214.*
- Hernández A, Pérez JM, Bosch D & Rivero L. (1999). Nueva versión de clasificación Genética de los Suelos de Cuba. AGRINFOR 64 p.
- Hernández PR. (2011). Producción de posturas: Desde la semilla hasta el humo. En: <http://www.guerrillero.cu/tabaco>. Potenciado por Joomla. Generado: 8 December, 2011, 13:02.

- Hirano, A. (1997). Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry* 11: 3065–3066.
- Infoagro. (2011). El Cultivo de Tabaco. En: http://www.url.edu.gt/otros_sitios/noTabaco/08-01cult.htm. Fecha de búsqueda: 4 de diciembre del 2011.
- Izquierdo, H. et al., (2006) Avances en el conocimiento del Pectimorf, un biorregulador cubano del crecimiento con actividad biológica *in vitro* y *ex vitro* en las plantas. XVI Forum de Ciencia y Técnica.
- Izquierdo, H. et al., (2009). Influencia de un oligogalacturónido en la aclimatización de vitroplantas de banano (*Musa spp.*) del clon FHIA-18 (AAAB). *Cultivos Tropicales* (aceptado).
- Klarzynski, O., Fritig, B. (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences*, 324: 953-963.
- Kuč, J. (2000). Development and future direction of induced systemic resistance in plants. *Crop Prot.*, 19: 859-861.
- Lárez, C. (2006). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 4: 91-109.
- López, M. et al. (1983). Cultivo de plantas. Tomo 1. M. E. S. Universidad Central de Las Villas, p. 234.
- Mari, J. M., L. N. Hondal. (1984): El cultivo del tabaco. Ed. Pueblo y Educación. La Habana. 122 p.
- Mari, J. M., L. N. Hondal. (1991): El cultivo del tabaco. Ed. Pueblo y Educación. La Habana. 122 p.
- Mariña, Carmen. (2004). Comportamiento del tabaco negro tratado con Biobras 16 y distintas dosis de estiércol vacuno y cachaza, en suelo Fluvisol de Vuelta Arriba. En: Informe Parcial de Proyecto. I. I. A. "Jorge Dimitrov".
- Majesti, N. V. y Ravi, K. (2001). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Funtional Polymers*. 46 p.

- Mayea, S. S., L. Herrera y C. M. Andrea. (1983): Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba. Ed. Pueblo y Educación. La Habana, 204 p. CITMA. Provincia Granma 10 p.
- Messiaen, J. (1994). La transduction du signal chez les végétaux supérieurs en réponse à une attaque pathogène: Identification de réponses membranaires: cytosoliques et nucléaires induites par des oligogalacturonides. Tesis Doctoral. Universidad de Namur.
- MINAGRI. (1998): Instructivo Técnico para el cultivo del tabaco. Instituto de Investigaciones del Tabaco. 128 p.
- MINAGRI. (2001). Instructivo Técnico para el cultivo del tabaco. Manual Técnico para el cultivo del tabaco negro al sol, recolectado en hojas y en mancuernas. Cuba. 27 p.
- Mojena, M. y O. Cruz. (1998). Las asociaciones de cultivos. Contribución a la sostenibilidad ecológica, económica y social. Agric. Org. Año 4 No. 2: 12-14.
- Muñoz. E (1997). Principios y fundamentos de la integración agrícola ganadera. Agricultura Orgánica 3(1) pp11.
- Muzzarelli, R. A. (1994). Chitosan degradation by commercial enzymes. Journal of Biomaterials Science. Vol. 6(6). 497-500p.
- Nakamatsu, J. y Da Silva, R. (1998). Estudio de la modificación de los polímeros politetrafluoro de los polímeros politetrafluoroetileno y quitosana mediante tratamiento por plasma. Revista de Química de la Pontificia Universidad del Perú, 12 (2). 43-52 p.
- Naranjo, O. (2006). Evolución del pectimorf y Biobras-16 en la variedad de tabaco H-92. Trabajo de Diploma. Universidad de Granma.
- Nge, K. L.; N. Nwe, S. Chandkrachang and W. F. Stevens. (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. Journal of Plant Science 170:1185-1190.

- Nieto, M.; C. Mariña, A. Rosabal, P. Castillo, B. Pérez. (2001). Aprovechamiento racional y conservación de los suelos Fluvisoles dedicados al cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* Lin) bajo condiciones edafoclimáticas de la zona oriental de Cuba. En: Informe Parcial de Proyecto. I. I. A. "Jorge Dimitrov". CITMA. Provincia Granma 7 p.
- No, H. y Meyer, S. (1995). Preparation and characterisation of chitin and chitosan a review J. Aquat food Prod. Technol. 14. 27-52 p.
- No, H. y Meyer, S. (2002). Antibacterial Activities of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights on Spoilage Bacteria Isolated from Tofu. Journal of Food Science. Vol. 67(4). 1511-1514p.
- Núñez, J. A. (1997). "Desde el viaje del habano". Cohíba la excelencia en Aniversario. Tabaco p 20 – 23.
- Ohta, K., Taniguchi, K., Konishi, N., Hososki, T. (1999). Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma glandiflorum*. HortScience 34, 233–234.
- ONE. Oficina Nacional de Estadísticas. (2010). Cuestionarios Nacionales respondidos por la oficina Nacional de Estadísticas de Cuba. AGRICULTURA, GANADERÍA, SILVICULTURA Y PESCA. En: <http://www.one.cu/cuestionariosinternacionales.htm>
- Osmond, D. L. y C. D. Raper. (1982). Crecimiento y acumulación de nitrógeno en las plantas de tabaco según son afectadas por la concentración de nitratos, la temperatura radicular y la temperatura del aire. Inf. Express. Tabaco. Vol. 6. No. 2(11): 7.
- Pérez .S. y O. Rodríguez. (2000). Dosis y momento de la aplicación del humus de lombriz en tabaco tapado. Instituto de Investigaciones del Tabaco. MINAGRI: Reunión Nacional de Investigadores y Productores de Tabaco. La Habana. Cuba. p 7.
- Pita, O., Y. Cuellar. (2001). Efecto del bioestimulador de crecimiento ENERPLANT en el rendimiento y la calidad del tabaco tapado. Revista

CUBATABACO.Vol. 2, No.2, p:15.

- Pospieszny, H.; S. Chirkov and J. Atabekov. (1991). Induction of antiviral resistance in plants by chitosan. *Plant Science* 79: 63-68.
- Prasada Rao, T. D. (1982). Obtención de mayores rendimientos y mejor calidad de la producción de tabaco en suelos ligeros por un buen sistema radicular. *Inf. Express. Tabaco*. Vol. 8. No. 1 (14): 13.
- Quintana, G. (1981). Uso de la alternancia continua y su influencia en el cultivo del tabaco. *Ciencia Técnica. Agricultura. Tabaco*. 13 (2).
- Ramírez, W. (2007). Conferencia de tabaco. Instructivo de Investigaciones Agropecuario Jorge Dimitrov. Bayamo. Granma.
- Rinaudo, M. y Domard, A. (1983). Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* Vol. 5. 49-52 p.
- Rodríguez, M.; L. Albertengo, I. Vitale and E. Agulló. (2003). Relationship between astringency and chitosan saliva solutions turbidity at different pH. *Journal of Food Science* 68: 665-667.
- Rodríguez, A. (2008). Evaluación de tres dosis de quitosana en el cultivo del tabaco. Diploma. Universidad de Granma. p 38.
- Roig, J. T., y Mesa. (1975). *Diccionario Botánico de nombres vulgares cubanos*. Ed. Pueblo y Educación. 884 p.
- Sharathchandra, R. G.; S. N. Raj, N. P. Shetty, K. N. Amruthesh and H. S. Shetty. (2004) . A Chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection* 23: 881–888.
- Chibu, H. and H. Shibayama. (2001). Effects of chitosan applications on the growth of several crops. In: T. Uragami, K. Kurita and T. Fukamizo, Editors. *Chitin and Chitosan in Life Science*, Yamaguchi. 235–239. ISBN 4-906464-43-0.

- Shin-Ya, Y. (1998). Chitosan hydrolysis using chitosanalytic enzymes modified with poly alkyleneoxide-maleic anhydride copolymers. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. Vol. 31(6). 930-935p.
- Tariman, C. y M. Y. Majumder. (1982). Efectos de los fertilizantes nitrogenados y potásicos sobre el rendimiento y calidad del tabaco (*N. Tabacum*). *Inf. Express*. Vol. 6. No. 1(10): 12-13.
- Terbojevich, M. (1996). Chitosan: Chain rigidity and mesophase formation. *Carbohydrate Research* 209: 251–260.
- Tolaimate, A.; A. Desbrieres, M. Rhazi, A. Alagui, M. Vicendon and P. Vottero. (2000). On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristic of chitosan from squid chitin. *Polymer* 41: 2463-2469.
- Torrecilla, G., L. A. Pino, D. Frangarrillo y A. Duarte. (1999). Manejo y situación actual de los recursos genéticos del tabaco en Cuba. *CUBATABACO*. 1 (1): 20.
- Tso, T. C. (1977). "Tobacco Potential Food Source and Smoke Material", *Beitrage Zur Tabakforrchung*, 9 (2): 63-66.
- Vander, P., Varum, K., Domard, A., Gueddari, N. y Moerschbacher, B. (1998). Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol*. Vol. 118. 1353-1359.
- Vázquez, Maidelis (2004). Efecto de la rotación de cultivos en el crecimiento y rendimiento de tabaco negro (*Nicotiana Tabaco L.*). Tesis de Diploma. UDG.
- Wanichpongpan, P.; K. Suriyachan and S. Chandkrachang. (2001). Effects of chitosan on the growth of Gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*). In: T. Uragami, K. Kurita and T. Fukamizo, Editors. *Chitin and Chitosan in Life Science*, Yamaguchi, p 198–201.

- Yalpani, M. y Pantaleone, M. (1994). An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. Carbohydrate. Research. Vol. 256. 159-175p.
- Zhang, D. and P. C. Quantick. (1998). Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 73: 763– 767.
- Zullo, M, J. Adam. (2002). Brassinosteroid phitohormones. Structure. Bioactivity and applications. Braz. J. Plant Physiol, p. 143 – 181.

ANEXOS

Figura 1.- Prestigioso productor Alejandro Robaina, el cual muestra túneles con posturas de tabaco producidas en semilleros en bandejas aéreas.



Figura 2.- Esquema simplificado para la obtención de quitina y quitosana a partir de conchas de crustáceos

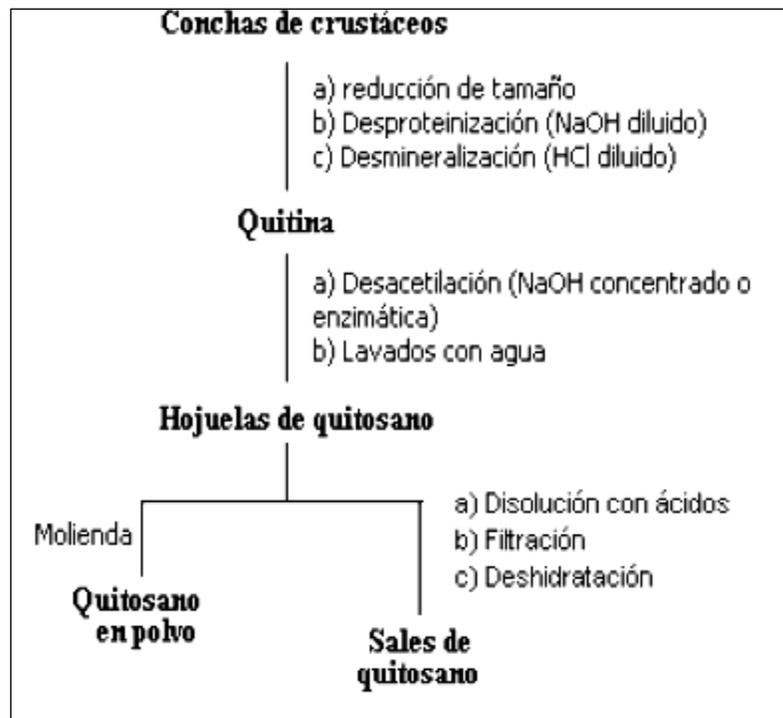
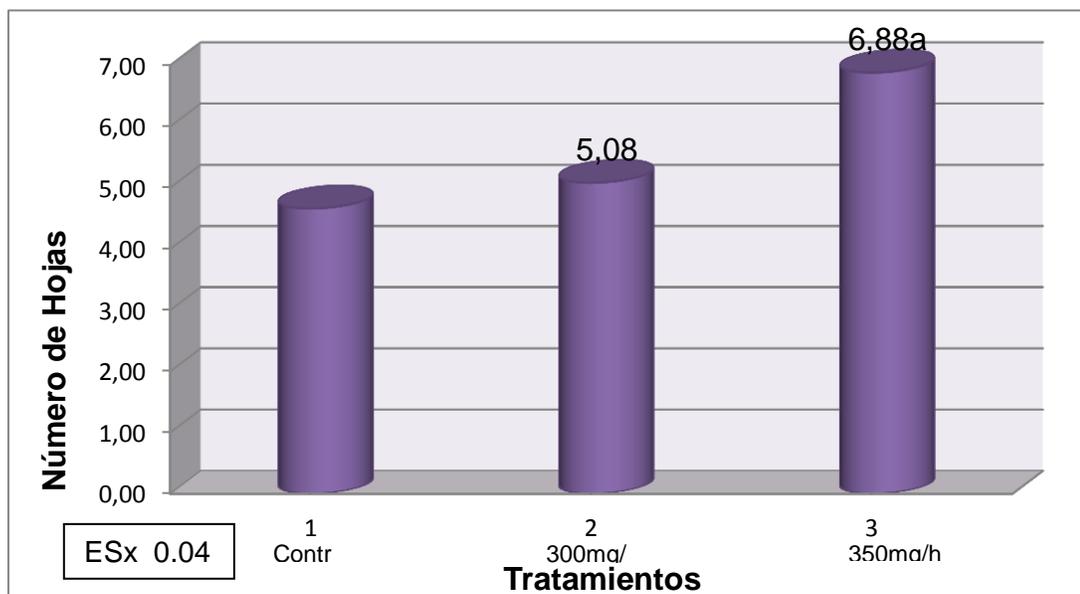


Figura 3.- Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el número de hojas en el momento de trasplante.



Medias con letras iguales no difieren significativa para $p \leq 0.05$ según prueba de Tukey.

Figura 4.- Desarrollo foliar de postura de tabaco con la aplicación de $350\text{mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de quitosana.

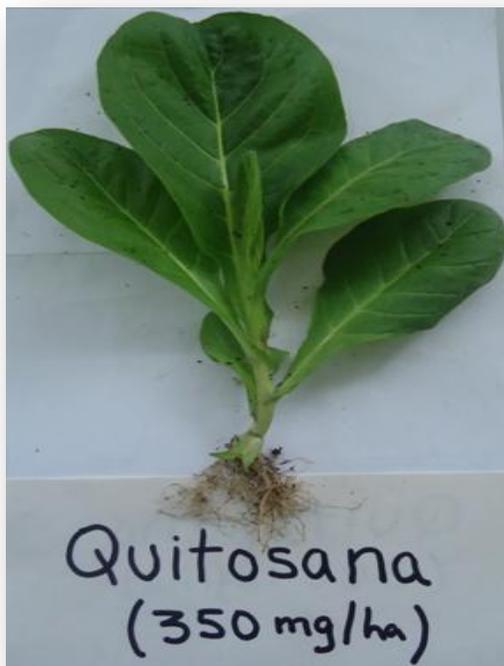
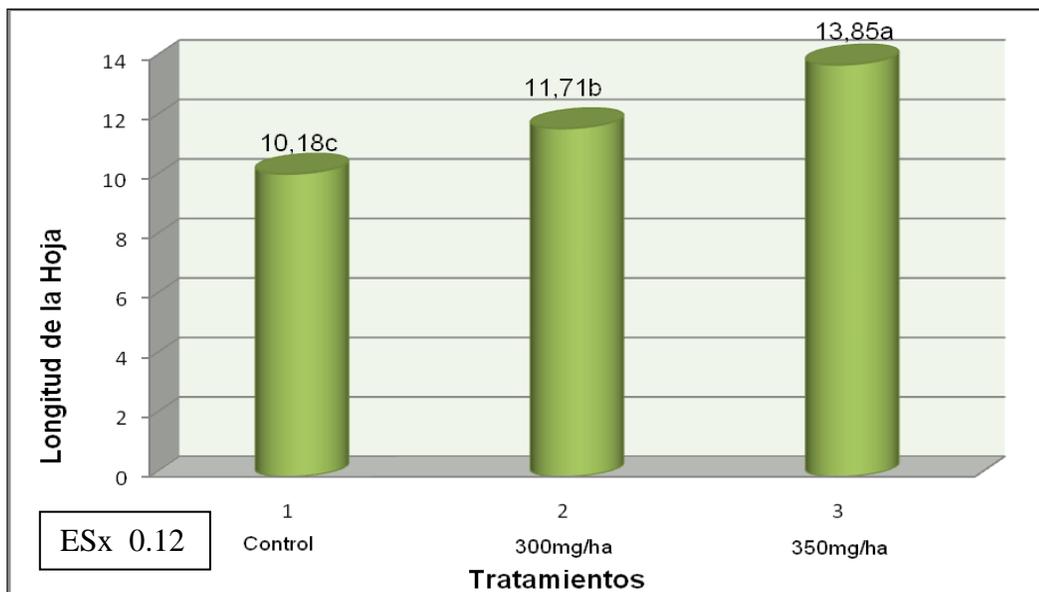
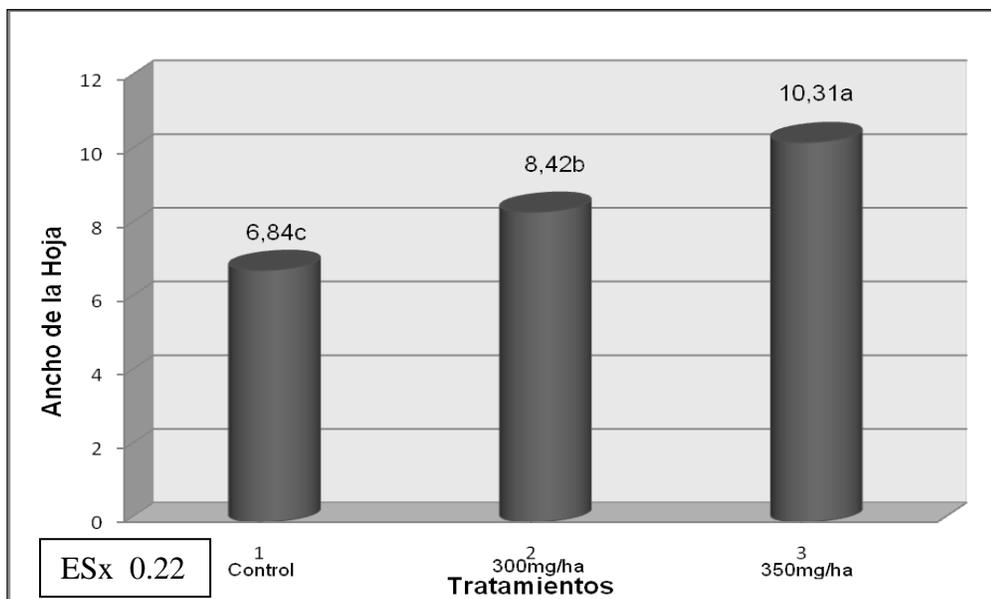


Figura 5. Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en la longitud de la hoja en el momento de trasplante.



Medias con letras iguales no difieren significativa para $p \leq 0.05$ según prueba de Tukey.

Figura 6. Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el ancho de la hoja en el momento de trasplante.



Medias con letras iguales no difieren significativa para $p \leq 0.05$ según prueba de Tukey.

Figura 7. Postura de tabaco, obtenida con la aplicación de $350\text{mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de quitosana. Se muestra el ancho de la hoja de mayor diámetro.

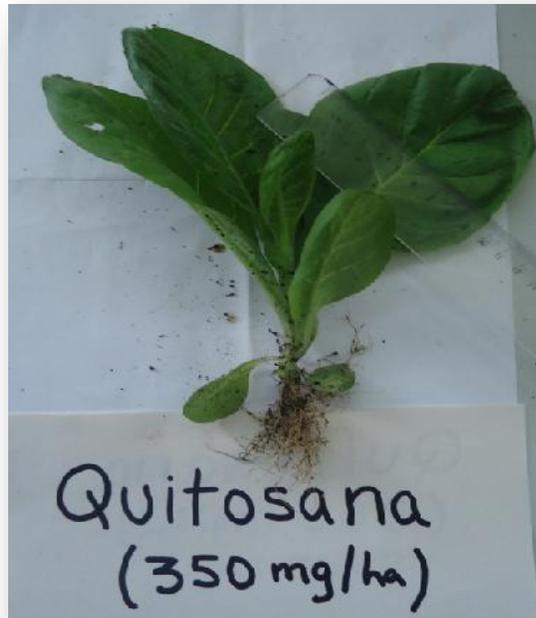
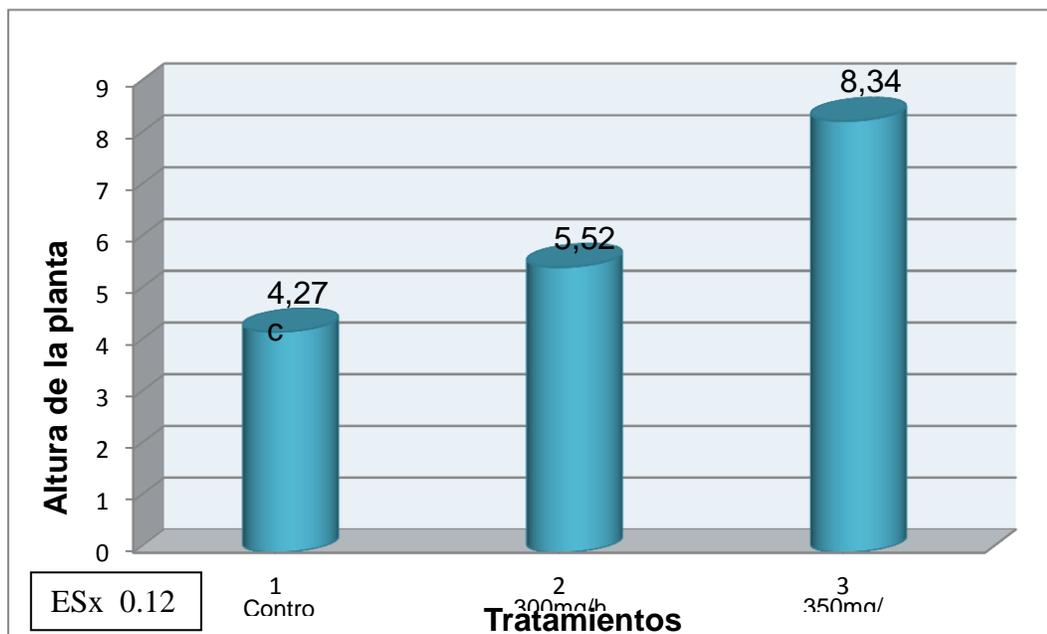
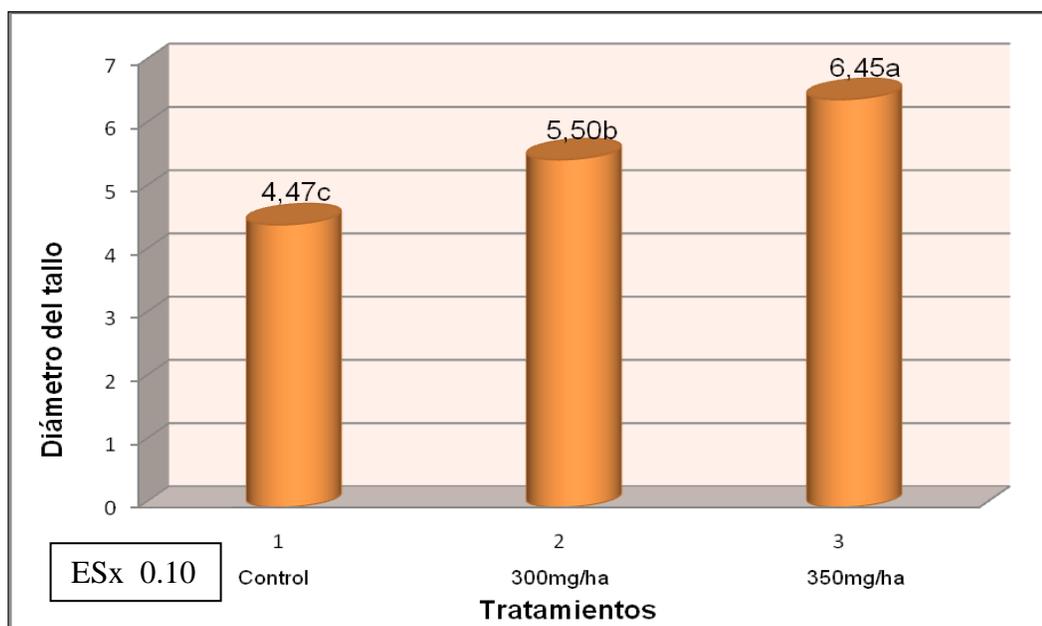


Figura 8. Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en la altura de las plantas en el momento de trasplante.



Medias con letras iguales no difieren significativa para $p \leq 0.05$ según prueba de Tukey.

Figura 9. Influencia de la aplicación de diferentes dosis de quitosana en el diámetro del tallo en el momento de trasplante.



Medias con letras iguales no difieren significativa para $p \leq 0.05$ según prueba de Tukey.

Figura 10. Desarrollo del tallo de posturas de tabaco con la aplicación de $350 \text{ mg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de quitosana.

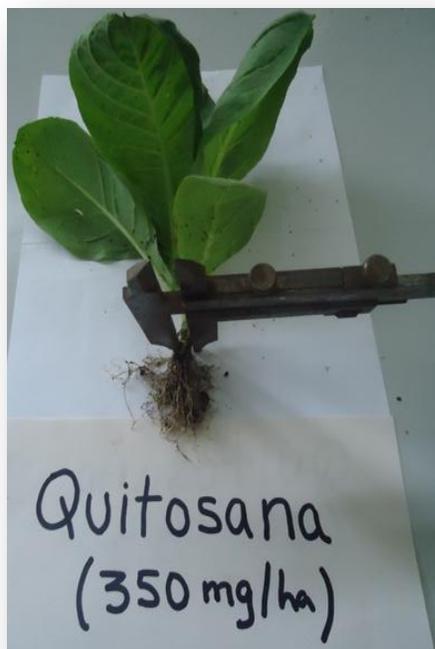


Figura 11. Influencia de la aplicación de quitosana en el desarrollo de posturas de tabaco.



Tabla 1: Comportamiento de la masa fresca y seca, promedio de la parte aérea y de la raíz en posturas de tabaco al momento de trasplante.

Tratamientos	Masa fresca (g).		Masa seca (g).	
	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
Control	7,47c	0,49n.s	0,63c	0,09c
Quitosana (300 mg-ha ⁻¹).	11,25b	0,82n.s	0,93b	0,10b
Quitosana (350 mg-ha ⁻¹).	16,43a	0,96n.s	1,21a	0,15a
ES _x	0.14	0.04	0.24	0.02

Medias con letras iguales no difieren significativa para $p \leq 0.05$ según prueba de Tukey.

Tabla 2. Evaluación económica de los resultados obtenidos.

Tratamientos	Posturas producidas/ha	Valor de la producción (\$)	Valor agregado de la producción (\$)	Beneficio (\$)
Control	2 950 000	132 750	-	-
300 mg.ha ⁻¹ de quitosana	3 220 000	144 900	12 150	1,09
350 mg.ha ⁻¹ de quitosana	3 400 000	153 000	20 250	1,15

Medias con letras iguales no difieren significativa para $p \leq 0.05$ según prueba de Tukey.