



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR**

**SISTEMA DE POSTGRADO UNIVERSIDAD AGRARIA  
DEL ECUADOR**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA SANIDAD VEGETAL**

**PROYECTO DE TITULACIÓN COMO REQUISITO PREVIO PARA  
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MAGÍSTER EN SANIDAD VEGETAL**

**EFICIENCIA DEL ACEITE *Myristica fragrans* Y  
DIFERENTES BIOFUNGICIDAS SOBRE *Mycosphaerella  
fijensis* Morelet *Musa AAA*, BAJO CONDICIONES  
CONTROLADAS.**

**ING. ANGÉLICA LORENA GRISALES SALAZAR**

**GUAYAQUIL, ECUADOR  
2022**

# SISTEMA DE POSTGRADO UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR

## CERTIFICACIÓN

El suscrito, Docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de director **CERTIFICO QUE:** he revisado el Trabajo de Titulación, denominada: **EFICIENCIA DEL ACEITE *Myristica fragrans* Y DIFERENTES BIOFUNGICIDAS SOBRE *Mycosphaerella fijensis* Morelet *Musa* AAA, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**, el mismo que ha sido elaborado y presentado por el/la estudiante, **Ing. Grisales Salazar Angelica Lorena**; quien cumple con los requisitos técnicos y legales exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador para este tipo de estudios.

Atentamente

---

**Ing. Danilo Valdez Rivera MSc.**

Guayaquil, 25 de mayo de 2022

**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR  
SISTEMA DE POSTGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL**

**TEMA**

**EFICIENCIA DEL ACEITE *Myristica fragrans* Y DIFERENTES BIOFUNGICIDAS  
SOBRE *Mycosphaerella fijensis* Morelet *Musa* AAA, BAJO CONDICIONES  
CONTROLADAS**

**AUTOR**

**ING. GRISALES SALAZAR ANGELICA LORENA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**APROBADA Y PRESENTADA AL CONSEJO DE POSTGRADO COMO  
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**MAGISTER EN SANIDAD VEGETAL**

**TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN**

**Ing. Colón Cruz Romero, MSc.**

**PRESIDENTE**

**Ing. Alex Castro García, MSc.**

**EXAMINADOR PRINCIPAL**

**Ing. Danilo Valdez Rivera, MSc.**

**EXAMINADOR PRINCIPAL**

**Ing. Albino Ávila Franco, MSc.**

**EXAMINADOR SUPLENTE**

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Agraria del Ecuador, que a través del SIPUAE me abrió las puertas de esta noble institución para especializarme y contribuir con el desarrollo del sector agrícola del país.

A mi tutor por el apoyo que me ha brindado, con consejos y sugerencias para el desarrollo del presente trabajo.

A NEMALAB por proporcionarme las instalaciones de su laboratorio para el desarrollo del trabajo experimental.

A el ing. Juan Prado por contribuir con sus conocimientos y experiencia en el sector bananero ecuatoriano necesarios en esta investigación.

A Christian Rodríguez y su familia por el amor, apoyo y paciencia que me han brindado para cumplir mis metas.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis padres María Lilia Salazar y Luis Fernando Grisales, que me apoyaron de forma incondicional, confianza en mi poder llegar a ser un Profesional de la patria.

A la familia Rodríguez Alarcón, por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de mi carrera universitaria.

A mis amigos más leales, que siempre estuvieron apoyándome en todo momento brindándome su cariño.

## **RESPONSABILIDAD**

La responsabilidad, derecho de la investigación, resultados, conclusiones y recomendaciones que aparecen en el presente Trabajo de Titulación corresponden exclusivamente al Autor/a y los derechos académicos otorgados a la Universidad Agraria del Ecuador.

**ING. GRISALES SALAZAR ANGELICA LORENA**

**C.I. 0961282829**

## RESUMEN

Este estudio se realizó en condiciones de laboratorio y pruebas de campo en la Hacienda Carolina, ubicada en el cantón Balao. El banano en Ecuador, es uno de los cultivos más importantes debido a la creciente demanda del mismo, por su aporte al sustento de las familias campesinas, la rentabilidad comercial, los diversos usos en poscosecha y las ventajas climáticas de adaptabilidad de la planta. Lamentablemente el manejo fitosanitario de plagas y enfermedades constituye una limitante de importancia para la producción del cultivo, ya que la incidencia de sigatoka negra, causa grandes pérdidas al afectar la calidad de la fruta incidiendo en su exportación. Por lo tanto, se hace necesario buscar nuevas alternativas para su manejo. Por esta razón se evaluó la eficiencia antifúngica de aceites esenciales y un extracto vegetal. Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), y el método de agar envenenado en las unidades experimentales in vitro, observando variables como crecimiento micelial y producción de esporas del hongo. En campo se observó la severidad y el estado de infección de la enfermedad. El aceite de *Miristica fragrans* mostro una significativa actividad, registrando una inhibición del micelio del 100%. constatando las propiedades antifúngicas del aceite esencial *Miristica fragrans*.

**Palabras clave:** Aceites esenciales, antifungico, Sigatoka negra, banano, patogenicidad.

## SUMMARY

This study was carried out under laboratory conditions and field tests at Hacienda Carolina, located in the Balao canton. Banana in Ecuador is one of the most important crops due to the growing demand for it, for its contribution to the livelihood of peasant families, commercial profitability, various post-harvest uses and climatic advantages of adaptability of the plant. Unfortunately, the phytosanitary management of pests and diseases constitutes an important limitation for crop production, since the incidence of black sigatoka causes great losses by affecting the quality of the fruit, affecting its export. Therefore, it is necessary to look for new alternatives for its management. For this reason, the antifungal efficiency of essential oils and a plant extract was evaluated. The completely randomized design (DCA) and the poisoned agar method were used in the in vitro experimental units, observing variables such as mycelial growth and production of fungal spores. In the field, the severity and infection status of the disease were observed. *Myristica fragrans* oil showed significant activity, registering a 100% inhibition of the mycelium. verifying the antifungal properties of the essential oil *Myristica fragrans*.

Keywords: Essential oils, antifungal, black Sigatoka, banana, pathogenicity.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN .....	13
Caracterización del Tema.....	14
Planteamiento de la Situación Problemática.....	14
Justificación e Importancia del Estudio.....	15
Delimitación del Problema.....	15
Formulación del Problema.....	15
Objetivos.....	16
Objetivo General: .....	16
Objetivos Específicos: .....	16
Hipótesis o Idea a Defender.....	16
Aporte Teórico o Conceptual.....	16
Aplicación Práctica.....	17
CAPÍTULO 1 .....	18
MARCO TEÓRICO.....	18
1.1 Estado del Arte .....	18
1.2 Bases Científicas y Teóricas de la Temática.....	19
1.2.1 Generalidades del cultivo de banano .....	19
1.2.2 Importancia del banano en Ecuador.....	20
1.2.3 Sigatoka negra .....	20
1.2.4 Actualidad de los plaguicidas .....	22
1.2.5 Los biofungicidas .....	22
1.2.6 <i>Miristica fragrans</i> .....	23
1.2.7 <i>Mentha piperita</i> .....	24
1.2.8 <i>Thymus vulgaris</i> .....	25
1.2.9 <i>Moringa oleífera</i> .....	25
1.3 Fundamentación legal .....	26
CAPÍTULO 2 .....	28
ASPECTOS METODOLÓGICOS.....	28
2.1 Métodos.....	28
2.1.1 Modalidad y Tipo de Investigación .....	28
2.2 Variables.....	28
2.2.1 Variable Independiente.....	28
2.2.2 Variable Dependiente.....	29

2.2.3	Operacionalización de las Variables.....	30
2.3	Población y Muestra. ....	31
2.3.1	Población. ....	31
2.3.2	Muestra. ....	31
2.4	Técnicas de Recolección de Datos. ....	31
2.5	Estadística Descriptiva e Inferencial. ....	31
2.6	Diseño Experimental.....	33
2.7	Tratamientos.....	34
2.8	Cronograma de Actividades.....	35
	RESULTADOS.....	36
	DISCUSIÓN.....	44
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
	BIBLIOGRAFÍA CITADA .....	48
	ANEXOS.....	60
	APÉNDICES.....	62

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1. Cepa monosporica de <i>M.fijiensis</i> a)Forma y color de colonia b) observación de hifas en microscopio .....	36
Anexo N° 2. Gráfico de cajas Porcentaje de inhibición del hogo por tratamiento .....	39
Anexo N° 3. Gráfico comportamiento prueba de patogenicidad .....	40
Anexo N° 4. Gráfico de cajas severidad <i>M. fijiensis</i> semana 10.....	42
Anexo N° 5 Ficha técnica del aceite esencial de <i>Miristica fragrans</i> .....	60
Anexo N° 6 Ficha técnica de NoPath .....	60
Anexo N° 7 Escala de Stover modificada por Gauhl para sigatoka negra .....	61
Anexo N° 8 Prueba de Shapiro Wilks y Kruskall Wallis .....	61
Anexo N° 9 Recolección de material vegetal afectado por la enfermedad .....	62
Anexo N° 10 Elaboración de extracto de semilla de moringa .....	62
Anexo N° 11 Cultivo en PDA de material vegetal afectado por <i>M. fijiensis</i> .....	63
Anexo N° 12 Aislamientos <i>in vitro</i> de <i>M. fijiensis</i> .....	64
Anexo N° 13 Tratamientos biofungicidas <i>in vitro</i> sobre <i>M. fijiensis</i> .....	64
Anexo N° 14 Prueba de fitotoxicidad de los biofungicidas <i>en laboratorio</i> .....	64
Anexo N° 15 Aplicación de biofungicidas en plantilla de banano .....	65
Anexo N° 16 Conteo de estrías en las planta sometidas a tratamiento .....	65
Anexo N° 17 Análisis de evolución de la sigatoka negra en hojas 3-4 y 5 de la planta .....	66
Anexo N° 18 Estrías características de la sigatoka negra .....	66
Anexo N° 19 Certificado culminación de trabajo experimental.....	67
Anexo N° 20 Copia de cédula del propietario del lugar de estudio.....	68.

## ÍNDICE DE APÉNDICES

Tabla N° 1. Esquema andeva laboratorio.....	34
Tabla N° 2. Características experimento laboratorio .....	34
Tabla N° 3. Tratamientos a utilizar en laboratorio .....	35
Tabla 4. Rendimiento extracto vegetal.....	37
Tabla 5. Crecimiento micelial del hongo (mm) .....	37
Tabla 6. Producción de esporas .....	38
Tabla 7. Estado evolutivo final de Sigatoka negra.....	43

## INTRODUCCIÓN

La industria bananera en Ecuador representa los intereses económicos de muchas familias que han desempeñado esta labor por décadas, sin embargo, los problemas atravesados por este sector productivo del país están en constante evolución. Con todo, la seguridad alimentaria, las condiciones agroclimáticas para la producción de calidad, la participación de las industrias de insumos agrícolas y las medidas fitosanitarias que influyen sobre la actividad bananera, se busca satisfacer la gran demanda en los mercados internacionales (Jiménez et al., 2020).

El uso indiscriminado de plaguicidas altamente tóxicos, que se emplean en la producción de musa AAA, limita el eficiente control sobre las enfermedades fúngicas, como *Mycosphaerella fijensis* Morelet. Cabe señalar que, al desconocer la etiología de la enfermedad, la dosificación adecuada de los productos químicos, la inexistencia de una planificación adecuada en la que se permita rotar las moléculas y la falta de alternativas más ecológicas y amigables con los ecosistemas predispuso la resistencia de la sigatoka negra en el cultivo de banano.

Como explica (Cedeño et al., 2017) los manejos aplicados sobre sigatoka negra están ligados a prácticas culturales con agroquímicos, lo que origina el incremento la resistencia del patógeno a fungicidas de los grupos benzimidazoles, triazoles y estrobirulinas al incrementar dosis y frecuencias de aspersion de estos productos químicos.

A nivel mundial *Mycosphaerella fijensis* Morelet es la enfermedad en musáceas más importante, está clasificada como una enfermedad foliar que amenaza la seguridad alimentaria y que en este sentido representa un importante desafío para la industria bananera al comprometerse la reducción del rendimiento, calidad y rentabilidad del cultivo.

Se requiere encontrar nuevas alternativas con ingredientes activos naturales y biodegradables para el control de sigatoka negra como lo indica (Gutiérrez et al. (

2018) mediante los aceites esenciales obteniendo el 100% de inhibición, del hongo *Mycosphaerella fijensis* Morelet en condiciones in vitro al usar *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare* y *Pimienta dioica* en concentraciones de 500ppm.

De acuerdo a lo indicado por Arias et al. (2019) sobre el control de sigatoka negra por medio del hongo antagoista *Ganoderma lucidum*, al analizar sus proteínas activas y efectuar el ensayo se encontraron enzimas capaces de interferir en el desarrollo del hongo fitopatógeno.

Según (Jaramillo Aguilar et al., 2017) el gel de aloe vera presenta una actividad antifúngica moderada que puede ampliarse en función del aumento en la concentración, obteniendo un porcentaje de inhibición micelio de 44,84%. En este estudio también se evaluó *Trichoderma sp.* En la misma concentración de 1000ppm con un PIM de 38,62%.

### **Caracterización del Tema.**

La producción de banano en Ecuador requiere una disminución en la aplicación de productos químicos y la intervención de nuevas estrategias biológicas que nos permitan cuidar el ecosistema y la salud humana, apoyados en este estudio de carácter investigativo experimental para determinar si existe un efecto inhibitorio en *Mycosphaerella fijensis* Morelet por parte de los controles alternativos, asumiendo que representan una mejor elección en la interacción con la enfermedad.

### **Planteamiento de la Situación Problemática.**

El manejo fitosanitario del cultivo de banano en Ecuador ha estado marcado por el abuso de agroquímicos que induce la resistencia de los microorganismos patógenos cada vez de forma más acelerada, lo que ocasiona incertidumbre entre los productores por la constante restricción de los plaguicidas convencionales en los mercados internacionales, lo que afecta a los agricultores en sus labores diarias al desconocer el manejo adecuado de las plantas y no contar con alternativas eficaces, económicamente viables y fáciles de usar.

Numerosos aceites esenciales y microorganismos muestran efectos biocidas sobre diferentes bacterias, hongos e insectos; de este modo sus componentes biológicamente activos pueden ser utilizados como alternativa potencial para el control de enfermedades fitopatógenas sin comprometer el equilibrio del ecosistema y la salud humana.

### **Justificación e Importancia del Estudio.**

El rechazo al uso excesivo de plaguicidas en los cultivos de importancia alimentaria a nivel mundial va en aumento y la efectividad de estos controles fitosanitarios pierde fuerza al comprobarse que las enfermedades ya no son susceptibles a los agroquímicos.

La problemática del uso de productos químicos trasciende a un nivel socioeconómico y ambiental que afecta a las familias ecuatorianas, de tal modo que es necesario buscar alternativas que beneficien este sector agrícola.

En base a este precedente se busca obtener una herramienta de control para Sigatoka negra en el cultivo de banano y lograr la disminución de su incidencia, de manera que no se afecte el ecosistema y la salud humana, a través de aceites esenciales y otros microorganismos usados como una alternativa de biofungicida para el manejo de la enfermedad.

### **Delimitación del Problema.**

El presente trabajo se realizó en una finca bananera ubicada en la provincia del Guayas, cantón Balao, Coordenadas UTM X: 631766.8, Y: 9678175 con una duración de 6 meses aproximadamente. Se beneficiaron los productores de banano de la zona y la comunidad agrícola general.

### **Formulación del Problema.**

¿Cómo mejorará el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis morelet*) en banano (Musa AAA) a través de la eficiencia del aceite esencial de nuez

moscada (*Myristica fragrans*) y diferentes biofungicidas?

### **Objetivos.**

#### **Objetivo General:**

**Evaluar la eficiencia del aceite *Myristica fragrans* y diferentes biofungicidas en el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* Morelet) en banano (*Musa AAA*) bajo condiciones controladas.**

#### **Objetivos Específicos:**

- **Realizar la caracterización morfológica del fitopatógeno *Mycosphaerella fijensis* Morelet en el cultivo de banano mediante técnicas de observación microscópica.**
- **Determinar la eficacia de los tratamientos como biofungicida en el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* Morelet) en banano (*Musa AAA*) en laboratorio.**
- **Realizar una prueba de patogenicidad del hongo *Mycosphaerella fijensis* Morelet aplicando los tratamientos biofungicidas.**
- **Analizar el nivel de daño alcanzado por el hongo de *Mycosphaerella fijensis* Morelet en las plantas de banano después de los tratamientos.**

#### **Hipótesis o Idea a Defender.**

El aceite esencial de nuez moscada y demás biofungicidas aplicados en el cultivo de banano permitirán el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* morelet).

#### **Aporte Teórico o Conceptual.**

Concluido el trabajo de investigación se espera generar una nueva alternativa para el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* morelet) en el cultivo de banano a través de los ingredientes activos de plantas y microorganismos antagonistas empleados como biofungicidas.

### **Aplicación Práctica.**

Obtenidos los resultados de este estudio se pretende brindar la información a los productores bananeros del cantón Balao y demás organizaciones dedicadas a esta actividad productiva, así como a los docentes e investigadores de la Universidad Agraria del Ecuador sobre la eficiencia del aceite esencial de nuez moscada (*Myristica fragrans*) y diferentes biofungicidas y su capacidad en el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* morelet).

# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Estado del Arte

La participación de Ecuador en la producción y exportación mundial de banano ha incrementado aceleradamente, representando el 40% que corresponde a la región de América latina, debido a los beneficios en reducciones arancelarias obtenidos en 2019 con la Unión Europea (FAO, 2020). Ecuador cuenta con una superficie plantada de 173.706 hectáreas, las provincias más destacadas son Los Ríos (32,4%), El Oro (24,8%) y Guayas (21,1%)(INEC, 2019).

El desarrollo de la producción de banano y su creciente potencial exportador incide directamente en la agrobiodiversidad, desequilibra los ecosistemas naturales con la pérdida de las especies endémicas y se contaminan recursos naturales importantes para la vida, siendo un factor decisivo el inadecuado uso de pesticidas y las frecuencias de aplicación excesivas en el manejo fitosanitario del cultivo (Cabrera et al., 2020).

(Delgado-Oramas et al., 2020) y (Yu et al., 2020) manifiestan que los aceites esenciales son una mezcla de metabolitos secundarios volátiles y lipofílicos de origen natural que se pueden extraer de flores, hojas, semillas entre otras partes de la planta, conocidos por propiedades antifúngicas debido a la presencia de terpenos aldehídos y fenoles aromáticos que son sintetizados por las plantas como defensa contra patógenos.

Los aceites esenciales tienen una actividad antifúngica prometedora, debido a la sinergia de sus componentes químicos, que además no alteran el ecosistema y son seguros de usarse (Banani et al., 2018). También se menciona la inducción de resistencia del huésped contra el patógeno a largo plazo, así como el efecto protector en las plantas contra el estrés biótico y abiótico (Klein et al., 2017). Sin embargo, deben identificarse los elementos que otorgan eficacia contra los organismos

fitopatógenos.

En investigaciones realizadas sobre *Fusarium oxysporum*, la eficacia de los aceites alcanzo hasta un 99.3% de inhibición del hongo, que tuvo efecto en la inducción de resistencia sistémica de la planta (Moutassem et al., 2019).

Por otro lado, los extractos vegetales surgen como una alternativa a los fungicidas convencionales para controlar hongos patógenos, al intervenir en el desarrollo de la enfermedad y por ser un biocida de origen vegetal no presentan fitotoxicidad, ni acción residual, se degradan fácilmente, son seguros para el medio ambiente y el ser humano. Sin embargo, su campo de acción es específico, con una persistencia en campo limitada y una vida útil más corta (Meena et al., 2021).

(Déné, 2018) Expone la creciente demanda de medidas fitosanitarias en los cultivos debido a las enfermedades nuevas y existentes, propone el uso de extractos vegetales como alternativa potencial en la protección de plantas en lugar de los agroquímicos, puesto que estos fitopatógenos adquieren en la actualidad presentan resistencia a los productos químicos convencionales usados por los agricultores.

(Capa Benítez et al., 2016) Indica que los insumos utilizados en los métodos productivos no deben afectar la estabilidad del hábitat ni la conservación de las especies de la zona, además presentar seguridad ambiental (plantas, animales, microorganismos u otros factores abióticos). Lo que permite al productor ofrecer un producto de calidad, competitivo en otros mercados y por ende genera mayor ingreso.

## **1.2 Bases Científicas y Teóricas de la Temática.**

### **1.2.1 Generalidades del cultivo de banano**

El origen del banano se sitúa en el sudeste asiático en las regiones de India, Indonesia, Malasia y Nueva Guinea (Kraithong & Issara, 2021); Es una especie monocotiledónea, perteneciente a la familia de las musáceas del orden de las Zingiberales o Escitamiáceas (Chávez et al., 2017).

Botánicamente la planta tiene un cormo basal con un meristemo apical en forma de una corona aplanada de la que crecen las hojas dispuestas en espiral cuyas bases forman un pseudotallo. Solo se produce una flor a partir del cormo, que consta de flores femeninas y masculinas, aunque también pueden presentarse flores hermafroditas entre ellas. La fruta es una baya partenocárpica y el sistema de raíces es adventicio, producen raíces laterales cortas y delgadas de hasta unos 8 mm de diámetro que pueden extenderse hasta 5 metros (Vilhena et al., 2019).

### **1.2.2 Importancia del banano en Ecuador**

En el gobierno de Galo plaza surge la producción y exportación de banano, en virtud de las políticas desarrollistas que buscaban la modernización de la economía a través de nuevas tecnologías y créditos para el sector agrícola (Gonzabay, 2017).

El principal sector agrícola del Ecuador es la industria bananera, directamente de este cultivo vive el 10% de la población siendo mano de obra directa 1,1 persona por hectárea. Representa el 27% del total de sus exportaciones agrícolas y el 8% del valor de todas sus exportaciones (Elbehri et al., 2015).

Ecuador desde hace muchos años destaca como primer exportador a nivel mundial de banano, debido a las ventajas asociadas a factores climáticos; sin embargo, compite con otros países por los mismos mercados de consumo mejor posicionados geográficamente (Del Cioppo Morstadt & Salazar, 2015).

### **1.2.3 Sigatoka negra**

La enfermedad foliar más limitante en musáceas es la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet.), es considerada una amenaza para la seguridad alimentaria siendo catalogada dentro de las enfermedades más influyentes en los cultivos tropicales, al reducir la capacidad fotosintética de área foliar en la planta. La Sigatoka negra se identificó por primera vez en América cuando se detectó en Honduras en 1972 (Drenth & Guest, 2016).

*Mycosphaerella fijiensis* es un hongo hemibiotrófo que segrega una serie de metabolitos secundarios que son tóxicos para plantas de banano, fitotoxinas como juglone que funciona como un factor de agresividad y un aumento de la enfermedad al inhibir algunas enzimas implicadas en la transpiración de la planta, al mismo tiempo se activan las respuestas químicas y se activan fenilfenalenonas a nivel celular en los estomas de las hojas de Musa (Hidalgo et al., 2016; Noar & Daub, 2016).

La Sigatoka negra afecta directamente procesos fisiológicos básicos como fotosíntesis y transpiración, así como la resistencia y la actividad estomática, directamente proporcional a la severidad de la enfermedad; retrasa la floración y la cosecha y reduce tanto el llenado del racimo como la calidad de la fruta (Escobar et al., 2015).

Los efectos de Sigatoka negra en el crecimiento, producción y calidad de la fruta son económicamente importantes y se presenta la disminución del peso del racimo así como el largo de dedos y por ende un menor llenado del fruto, en muchas ocasiones ocurre la maduración prematura (fruta crema) lo que dificulta su comercialización en el mercado previsto (Oiram et al., 2019).

Los cultivares de banano de exportación son plantas triploides, solo pueden propagarse clonalmente y el sistema productivo es por monocultivo lo que lo convierte altamente susceptible a la sigatoka negra; las propuestas para su manejo están en su mayoría encaminadas a la prevención y obtención de genotipos resistentes siguen siendo estudiadas (Isaza et al., 2016; Sánchez et al., 2016).

La resistencia genética está en la mayoría de cultivares comerciales de banano, las consecuencias evidentes del uso enorme de pesticidas incrementan los costos de producción y un impacto negativo en el medio ambiente. Los fungicidas inhibidores externos de la quinona de la familia estrobilurinas al igual que el grupo de los triazoles, aminos, provocan mutaciones y debido a su excesiva aplicación,

favorecen la emergencia de cepas del patógeno más resistentes (Brito et al., 2015).

Estas prácticas convencionales en el manejo que acrecientan la resistencia de enfermedades fitopatógenas, sufren una creciente imposición regulatoria sobre el uso de insumos para este fin, a causa de la legislación sobre los residuos de plaguicidas en las frutas, el medio ambiente y la salud de los trabajadores (Lucas et al., 2015).

Son necesarias nuevas estrategias de manejo que permitan enfrentar la agresividad del patógeno para que la carga química en el cultivo se reduzca, en la que se debe incluir agentes biológicos, entomopatógenos y la nutrición vegetal, que predisponen los sistemas de defensa de la planta, aumentando la lignificación y la síntesis de fitoalexinas (Aguirre et al., 2015; Cavero et al., 2015; Marcano et al., 2016).

#### **1.2.4 Actualidad de los plaguicidas**

La reorganización de la industria agroquímica en los últimos años se presenta de forma severa, al reducir el número de ingredientes activos disponibles en el mercado; además de las exigencias para el registro de plaguicidas que deben estar sujetos a la disminución de su uso, sumado a un plan de sostenibilidad para protección del medio ambiente. Alrededor del 50% de los plaguicidas disponibles en la década de 1990 han sido desvinculados, eliminando ingredientes activos que representan peligro para los ecosistemas y la salud humana (Gullino & Tavella, 2020).

#### **1.2.5 Los biofungicidas**

En agricultura últimamente se han aplicado durante muchos años los compuestos naturales, principalmente sales, aceites, extractos y se han explotado cada vez más para el manejo de enfermedades. Es importante mejorar el conocimiento sobre los productos aplicados en la agricultura ecológica ya que permite comprender el potencial de algunos productos naturales. Además estos productos de diferentes orígenes naturales intervienen en la capacidad de inducir

resistencia en las plantas por medio de los elicitores que son importantes en la relación patógeno huésped (Alexandersson et al., 2016).

El progresivo interés en su uso, se basa en su amplio espectro de actividad, ya que frecuentemente actúan sobre el huésped en lugar de sobre el patógeno, igualmente son una alternativa para reducir los fungicidas sintéticos debido a que han demostrado acción duradera fortaleciendo así la defensa de la planta (Le Mire et al., 2016).

A pesar de que su eficacia no es tan completa y eso es debido generalmente está influenciado por varios factores como el patógeno objetivo, el genotipo de la planta y su etapa de desarrollo, las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa), el momento, la formulación y el tipo de aplicación (Theresa & Radhakrishnan, 2021).

#### **1.2.6 *Miristica fragrans***

Carretero, (2009) sostiene que “diversos estudios con aceite esencial de nuez moscada tanto in vitro como in vivo han demostrado actividad antibacteriana y antifúngica ya que contiene miristicina que es un insecticida y acaricida natural” (p.1).

En estudios realizado por (Narasimhan & Dhake, 2006) se encontró que los constituyentes aislados de *M. fragrans* muestran una actividad antibacteriana apreciable contra los organismos grampositivos y gramnegativos. Esto indica el potencial de trimiristina, ácido mirístico y miristicina como compuestos para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos y antifungicos.

En evaluaciones ejecutadas por (Kozłowska et al., 2016) se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de nuez moscada contra gram positivos (*B. subtilis* y *S. aureus*), gram negativos (*P. putida* y *P. aeruginosa*) bacterias y hongos patógenos (*A. fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus*) utilizando el método de difusión en disco, se observó que los extractos de nuez moscada utilizados poseen considerable actividad antimicrobiana contra estos microorganismos. El extracto de acetona de

nuez moscada ha demostrado tener una fuerte actividad antimicrobiana que todos los demás extractos de nuez moscada utilizados.

Las semillas de nuez moscada tienen fuertes actividades antimicrobianas contra importantes bacterias patógenas y hongos. La actividad antimicrobiana que posee podría atribuirse a la aparición y concentración de diversas sustancias químicas presentes en ese extracto. Se han aislado tres lignanos, eritro-austrobailignan-6, ácido mesodihidroguaiarético y nectandrina-B del extracto metanólico de nuez moscada que se informó tener actividad antifúngica (Dorman & Deans, 2004).

Se ha informado que muchos fenólicos vegetales poseen actividad antimicrobiana. Algunos compuestos antimicrobianos importantes que se encuentran en la nuez moscada son el  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno, b-cariofileno y carvacrol. El  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno (hidrocarburos monoterpénicos de tipo pineno) están implicados en la rotura de la membrana por el lipófilo, así como el carvacrol ya que puede atravesar las membranas celulares y penetrar dentro de la célula donde interactúa con sitios intracelulares críticos para las actividades antimicrobianas. El p-cimeno también es componente importante porque es un precursor del carvacrol. Ha sido reportado que el p-cimeno muestra una débil actividad antibacteriana pero trabaja sinérgicamente con el carvacrol en la expansión de la membrana que a su vez, provoca la desestabilización de la membrana (Gupta et al., 2013).

### **1.2.7 *Mentha piperita***

El aceite esencial *M. piperita* ha demostrado actividad antimicrobiana, destacándose el efecto antifúngico para varias especies del género *Fusarium*, incluyendo también *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* y *Cladobotrium mycophillum*. El efecto inhibitor del aceite de *M. piperita* se puede atribuir a Dominio de los componentes de los monoterpenos, como el mentol y el mentofurano, que se ha demostrado que causan daño a la membrana celular del microorganismo induciendo una interrupción de su permeabilidad y interrupción de la proliferación

celular (Chraibi et al., 2021).

Los componentes químicos del aceite esencial de hojas frescas y sanas de plantas de *M. piperita* incluyen principalmente carvona, pulegona, petroselinato de metilo, d-limoneno y  $\rho$ -cineol, a los que se le atribuye la actividad antimicrobiana moderada contra las cepas microbianas (Satmi & Hossain, 2016).

### **1.2.8 *Thymus vulgaris***

*T. vulgaris* L. se reporta con una variedad de aplicaciones etnobotánicas debido a sus extensas propiedades respaldado por estudios modernos, que han demostrado la eficacia antibacteriana utilizando cepas normales y MDR de bacterias y hongos virulentos. Los estudios han demostrado que la presencia de  $\gamma$ -terpineno y p-cimeno, que son los precursores bioquímicos del timol y el carvacrol, son responsables de las propiedades antimicrobianas observadas en la planta (Patil et al., 2021).

Se encontró que el aceite esencial de tomillo es eficaz contra especies de hongos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora parasitica*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria brassicae*, *Trichoderma aggressivum f.sp. europaeum* y *Cladobotryum mycophilum* (Diáñez et al., 2018).

### **1.2.9 *Moringa oleífera***

*Moringa oleifera* Lam. Syn. (familia Moringaceae) es originaria del norte de la India y bien adaptado en los trópicos. Se sabe que este árbol es no tóxico para los seres humanos y los animales y debido a los usos como alimentos, en la industria, la medicina popular, y también debido a sus propiedades coagulante, fácil cultivo y rápido crecimiento, se conoce como un árbol de usos múltiples. Además, se demostró que extractos crudos y aceite esencial de *M. oleifera* tienen antifúngica actividad contra los dermatofitos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum canis*. También se ha observado que en el acuoso extracto de semillas de *M. oleifera* la presencia de proteínas activas contra hongos fitopatógenos que atacan cultivos de importancia económica (Gifoni et al.,

2012).

Moringa oleifera es una planta medicinal que ahora está emergiendo como una alternativa más segura y compatible a los fungicidas químicos. Todas las partes de la planta, incluidas las raíces, las flores, la corteza, el tallo, las hojas, las semillas y los aceites esenciales, poseen propiedades antimicrobianas. El análisis químico de estas partes morfológicas mostró que contienen un perfil de importantes minerales, vitaminas, proteínas y una gran cantidad de compuestos fitoquímicos que tienen actividad biológica y potencialmente pueden ser utilizados para retardar los efectos de los microorganismos. Informes recientes sobre análisis fitoquímicos de la hoja de M. oleifera revelaron la presencia de varios compuestos antioxidantes como ácido ascórbico, ácidos grasos y ácidos fenólicos (Ahmadu et al., 2020).

Se reporta la actividad inhibidora antifúngica de la proteína de unión de moringa-quitina (Mo-CBP3) aislada y purificada de las semillas de M. oleifera contra el crecimiento micelial y la germinación de esporas de Fusarium solani a una concentración mínima inhibitoria (MIC) (0.05 mgmL<sup>-1</sup>) con cambios ultraestructurales irreversibles (Batista et al., 2014).

### **1.3 Fundamentación legal**

#### **Ley Orgánica De Sanidad Agropecuaria**

Art. 4.- De los fines.- La presente Ley tiene las siguientes finalidades: a) Garantizar el ejercicio de los derechos ciudadanos a la producción permanente de alimentos sanos, de calidad, inocuos y de alto valor nutritivo para alcanzar la soberanía alimentaria; b) Impulsar procesos de investigación e innovación tecnológica en la producción de alimentos de origen vegetal y animal que cumplan las normas y desarrollo de estándares de bienestar animal, que mejoren el acceso a los mercados nacionales e internacionales; c) Fortalecer el vínculo entre la producción agropecuaria y el consumo local mediante la tecnificación de los procesos fito y zoonosanitarios de control y aseguramiento de la calidad de los productos agropecuarios; d) Garantizar que la cadena de producción pecuaria cumpla con

los estándares de bienestar animal que se establezcan en el reglamento de esta Ley y buenas prácticas zoonosanitarias. Que el Art. 5.- Derechos garantizados. - Esta Ley garantiza y procura a las personas, comunidades, pueblos, nacionalidades y colectivos el ejercicio de los derechos a la salud, a la alimentación, a un ambiente sano, equilibrado ecológicamente y los derechos de la naturaleza de conformidad con la Constitución y la Ley (Asamblea Nacional, 2017).

## **CAPÍTULO 2**

### **ASPECTOS METODOLÓGICOS**

#### **2.1 Métodos**

Método inductivo: Se aplicó este método con el objetivo de recoger la información de cada tratamiento para cumplir con los objetivos, a través de la observación y clasificación de los resultados en general.

Método deductivo: Permitió observar las variaciones que ocurrieron en los procesos de laboratorio y campo en el curso de la investigación del manejo del hongo fitopatógeno.

Método analítico: Se usó para conocer la relación entre los tratamientos biofungicidas y el efecto sobre fitopatógeno en estudio.

Método sintético: Permitió identificar y relacionar los resultados para la discusión de la hipótesis, concluir y recomendar los aspectos más importantes de la presente investigación.

#### **2.1.1 Modalidad y Tipo de Investigación**

La presente investigación se realizó en modalidad experimental con un enfoque investigativo de laboratorio y campo, a través de la toma de muestras y la evaluación de datos que resulten de cada tratamiento, respaldado por el uso de las técnicas de tipo analíticas y cuantitativas sobre el diseño experimental concerniente, con el propósito comprobar la eficiencia de los biofungicidas sobre la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* morelet).

#### **2.2 Variables.**

##### **2.2.1 Variable Independiente.**

La aplicación de diferentes biofungicidas (Aceite de nuez moscada, aceite de

tomillo + aceite de menta y extracto vegetal de Moringa) en laboratorio para la inhibición del fitopatógeno *Mycosphaerella fijensis* morelet.

### **2.2.2 Variable Dependiente.**

#### **VARIABLES A MEDIR EN LABORATORIO**

**Identificación del hongo:** Para encontrar la relación entre el agente causal de una enfermedad y la enfermedad que presenta una planta, se usó los postulados de Koch.

**Crecimiento micelial del hongo (mm):** a los 7 días se realizó la medición con el vernier de los datos de crecimiento del micelio del hongo de la caja Petri con medio PDA inoculadas con el hongo en tratamiento.

**Producción de esporas:** Una vez observado el crecimiento del hongo se contó el número de esporas por ensayo usando cámara de Neubauer y microscopio

#### **VARIABLES A MEDIR EN CAMPO:**

**Evaluación de la fitotoxicidad de los biofungicidas:** En laboratorio se trató las hojas de banano con los biofungicidas en estudio, se observó la reacción del tejido y posteriormente se verificó en campo.

**Prueba de patogenicidad eficacia de los biofungicidas:** 20 plantas de banano de 3 meses de edad, variedad Williams se trataron con los biofungicidas y el hongo *Mycosphaerella fijensis* morelet.

**Severidad de *Mycosphaerella fijensis* morelet en 10 semanas:** En las 20 plantas de banano de la prueba de patogenicidad establecidas en la Hacienda Carolina cantón Balao, se evaluó con el Método de Stover Modificado por Gauhl la severidad del fitopatógeno y se calculó la presión de la enfermedad en la plantilla.

### 2.2.3 Operacionalización de las Variables

TIPO DE VARIABLE		DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	TIPO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN
<b>INDEPENDIENTE</b>	La aplicación de diferentes biofungicidas en laboratorio y campo para la inhibición del fitopatógeno <i>Mycosphaerella fijensis</i> morelet	Evaluación en laboratorio y en campo de los diferentes biofungicidas en la inhibición del fitopatógeno <i>Mycosphaerella fijensis</i> morelet	Dosis de los biofungicidas en Agar envenedado (laboratorio) y en plantas de <i>Musa</i> AAA (campo)	Porcentaje de inhibición del fitopatógeno <i>Mycosphaerella fijensis</i> morelet	Cuantitativa	Vasos dosificadores
<b>DEPENDIENTE</b>	Control del fitopatógeno <i>Mycosphaerella fijensis</i> morelet		Crecimiento micelial del hongo en mm Producción de esporas Evaluación de la fitotoxicidad de los biofungicidas Severidad de <i>Mycosphaerella fijensis</i> morelet en 10 semana	Porcentaje de inhibición del hongo Numero de esporas presentes Presencia de daños en hojas Presencia de síntomas en hojas	Cuantitativa	Registros de laboratorio  Escalas de Severidad

## **2.3 Población y Muestra.**

### **2.3.1 Población.**

La población considerada para la realización del presente estudio estuvo conformada por un total de 40 unidades experimentales, repartidas en 3 tratamientos y un testigo absoluto en condiciones controladas.

### **2.3.2 Muestra.**

Para la investigación en vivero con la prueba de patogenicidad, se utilizaron 20 plantas de banano de 3 meses de edad.

## **2.4 Técnicas de Recolección de Datos.**

La técnica que se empleó en esta investigación es la observación directa en el laboratorio y en campo, con el uso de equipos y herramientas para la medición de las variables que permitan establecer la eficiencia de los biofungicidas sobre la sigatoka negra.

## **2.5 Estadística Descriptiva e Inferencial.**

Se utilizó el tratamiento de los datos recolectados para verificar la normalidad de los datos en el diseño completo al azar (DCA). con la prueba de Shapiro-Wilks. Para establecer las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, para la comparación de medias de resultados de los tratamientos, usando el Software estadístico Infostat.

## **Manejo del ensayo en laboratorio**

Toma de muestra: En campo se tomó muestra del fitopatógeno en el cultivo de banano con síntomas correspondientes al estadio 6 de la enfermedad de acuerdo a tabla de Stover para evaluación de *Mycosphaerella fijensis* morelet (Sepúlveda, 2016).

Manipulación de muestra: La muestra se trasladó al laboratorio, donde se realizó su respectiva identificación (Agrios, 2005).

Caracterización del fitopatógeno: Se realizó mediante pruebas microscópicas, revisión de literatura y los postulados de Koch. Posteriormente se realizó el aislamiento en caja Petri con sus respectivos repiques, constatando la presencia de fitopatógeno. Se tomó en cuenta para la identificación las características del micelio, color de la colonia, forma, tamaño y color de los conidios con observaciones microscópicas realizando montajes en portaobjetos (Volcy, 2008).

Cultivo del fitopatógeno: En cajas Petri con medio PDA, con un periodo de incubación de 3 a 7 días. *Mycosphaerella fijensis* Morelet, se aisló y conservó en Papa Dextrosa Agar (PDA) con 0,01 gr de ampicilina para evitar el crecimiento de bacterias, a 25°C.

Extracto vegetal: A partir de frutos de Moringa, empleando el equipo y el protocolo pertinente.

Agar envenenado: Se realizó la preparación del medio de cultivo con 1 gr/lit de ampicilina para evitar el crecimiento de bacterias, además se adicionó 0.05ml de Quicker por tratamiento para ayudar a la dispersión de los aceites esenciales al mezclarlos con el medio. Esta solución se adicionó en las cajas Petri, con su respectivo tratamiento biofungicida y 5mm del fitopatógeno cultivado anteriormente por 7 a días (Balouiri et al., 2016).

Crecimiento micelial del hongo (mm): Se tomó los datos a los 7 días de inoculación del hongo, con calibrador vernier. Adicionalmente se realizó la comparación del porcentaje del crecimiento de la colonia versus el testigo absoluto (Coello et al., 2017).

$$Cm = \frac{(T - Tr)}{T} \times 100\%$$

Donde:

T: testigo

Tr: tratamiento

Producción de esporas: Se adiciono 10 mL de agua destilada a los 7 días del crecimiento del hongo con los tratamientos por cada caja Petri y se realizó el conteo de la cantidad de esporas producidas por el hongo (Narváez et al., 2017).

$$\text{Esp/mm}^3 = \frac{(\#ec)(Fd)}{Fv}$$

Donde:

#ec: esporas contadas

Fd: factor de dilución

Fv: factor de volumen

Prueba de patogenicidad: Se aplicó los tratamientos biofungicidas en la plantilla de 3 meses de edad de la variedad Williams, obtenidos de las plantas existentes en la finca, seguido se inoculó las 20 plantas de banano con el hongo *Mycosphaerella fijensis* morelet, por medio de las cepas puras obtenidas anteriormente en laboratorio a través de la descarga de esporas; posteriormente los tratamientos se aplicaron con una frecuencia semanal.

Evaluación de *Mycosphaerella fijensis* morelet: se llevó a cabo la evaluación de las 20 plantas inoculadas con la tabla de severidad de Sigatoka, registrando los datos semanales por un periodo de tiempo de 10 semanas, además se realizó el cálculo de presión de la enfermedad en la plantilla.

## 2.6 Diseño Experimental.

Para la investigación en laboratorio se implementó un diseño completamente al azar (DCA), compuesto por 3 tratamientos, 1 testigo absoluto y 10 repeticiones de cada uno para un total de 40 unidades experimentales (cajas petri).

**Tabla N° 1. Esquema andeva laboratorio**

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Tratamientos	$(t - 1) (4 - 1)$	3
Error t	$t^*(r - 1) 4 (10-1)$	36
Total	$(t^*r - 1)(4*10 - 1)$	39

Elaborado por: Grisales, 2022

### 2.3. Diseño Experimental.

**Tabla N° 2. Características experimento laboratorio**

Diseño	Diseño Completamente al Azar
Numero de tratamientos	4
Numero de repeticiones	10
Método a utilizar	Agar envenenado
Numero de cajas Petri	40
Diámetro	55 mm
Altura	14,2 mm
Fitopatógeno	Círculos de 5mm en el centro de cada tratamiento.

Elaborado por: Grisales, 2022

### 2.7 Tratamientos.

Los tratamientos que se utilizaron en la investigación son 4 que consisten en aceites esenciales, extracto vegetal y un testigo absoluto con 10 repeticiones cada uno; con un total de 40 unidades experimentales.

El aceite esencial de *Miristica fragrans* se adquirió con SVA Organics con certificado USDA organic (Ver anexo 1), los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* + *Mentha piperita* se emplearán combinados a través del producto NoPath de la compañía Koppert Biological Systems (Ver anexo 1), mientras que el extracto vegetal de Moringa se preparó en laboratorio a partir de las semillas de la planta.

**Tabla N° 3. Tratamientos a utilizar en laboratorio**

Tratamientos	Descripción	Dosis	Aplicación
T1	Aceite esencial de <i>Miristica fragrans</i>	2ml/L	
T2	Extracto vegetal de Moringa	2ml/L	En medio de cultivo PDA (T1 a T3)
T3	Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> + <i>Mentha piperita</i>	2ml/L	
T4	Testigo absoluto	Sin aplicación de biofungicidas	

**Elaborado por: Grisales, 2022**

## 2.8 Cronograma de Actividades.

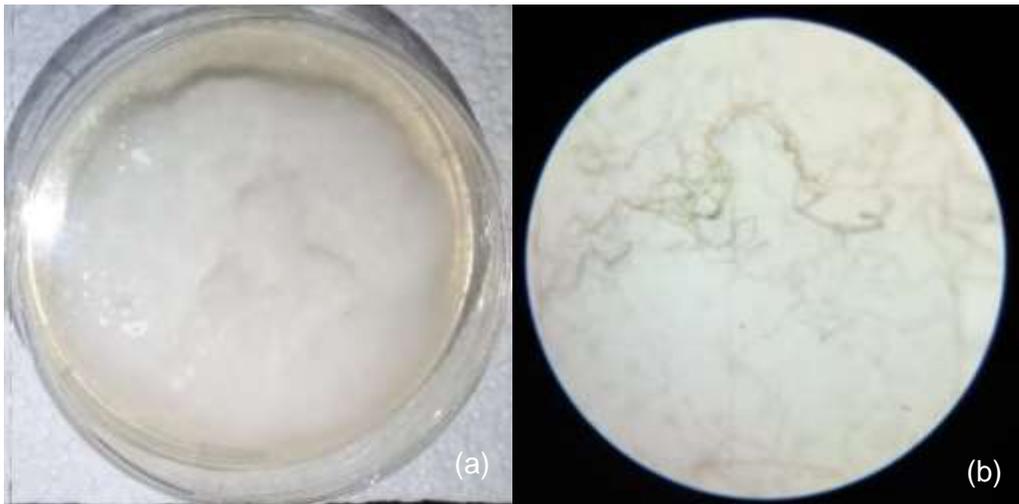
Actividades	Mayo 2021	Junio 2021	Julio 2021	Agosto 2021	Septiembre 2021	Octubre 2021	Noviembre 2021	Diciembre 2021	Enero 2022	Febrero 2022
Elaboracion del anteproyecto										
Revisiones tutor y estadística										
Sustentacion y aprobacion del anteproyecto										
Recoleccion de muestras										
Experimento en Laboratorio										
Experimento en vivero										
Experimento en campo										
Recoleccion de datos										
Analisis de datos										
Culminacion de tesis										
Revisiones tutor y estadística										
Sustentacion de tesis										

Grisales, 2022

## RESULTADOS

### Caracterización morfológica del fitopatógeno *Mycosphaerella fijensis* Morelet en el cultivo de banano mediante técnicas de observación microscópica.

Las observaciones realizadas en microscopio en los medios de cultivo obtenidos a partir de las muestras vegetales recolectados con la sintomatología correspondiente a la enfermedad, tratadas a través de los postulados de Koch para la obtención de cepa monospórica del fitopatógeno (Ver Anexo 1), mostraron que *M. fijensis* morfológicamente presenta un micelio que desarrollo en forma radial con aspecto algodonoso, de color blanco y grisáceo con una leve tendencia a color salmón con cubrimiento total de la caja Petri en el medio PDA. Los conidios presentaron una forma alargada, todas presentaron tabicación (septadas), con un ligero estrechamiento en los extremos, presentan color marrón pálido. Las hifas son septadas y alargadas.



Anexo N° 1. Cepa monospórica de *M.fijensis* a) Forma y color de colonia b) observación de hifas en microscopio

Elaborado por: Grisales, 2022

### Eficacia de los tratamientos como biofungicida en el control de sigatoka negra en laboratorio.

#### Preparación extracto vegetal

Las semillas secas de *Moringa oleífera* se obtuvieron del mercado local de la ciudad de Machala, se secaron a temperatura ambiente y se trituraron en el molino. Se

empleó 100 gr del material vegetal en 500ml de etanol al 96%, se incorporó en un recipiente de vidrio realizando agitación intermitente durante 48 horas. Posterior se procedió a separar el extracto del sobrenadante con papel filtro.

**Tabla N° 4. Rendimiento extracto vegetal**

Disolvente	Material vegetal (gr)	Tiempo (h)	Extracción (g)	Extracción (%)
<b>Etanol 96%</b>	100gr <i>Moringa oleifera</i>	48	330	66%

Grisales, 2022

El rendimiento que se obtuvo del extracto vegetal a partir de semillas *M. oleífera* esta expresado en porcentaje como se muestra en la tabla 4, que al realizarse el cálculo entre soluto y solvente corresponde al 66%. Es importante resaltar que, al utilizar etanol como disolvente se puede presentar evaporación de la solución al entrar en contacto con el medio ambiente, así como la retención del mismo liquido en el material vegetal, en este estudio incidió en un 34% de perdida durante el proceso de extracción.

### **Crecimiento micelial del hongo (mm)**

Las colonias de *M. fijiensis* con los tratamientos biofungicidas a través del agar envenenado fueron evaluadas a los 7 días con el vernier, registrando los valores del crecimiento del halo micelial correspondiente al fitopatogeno en estudio. Las medias del crecimiento micelial están indicados en milímetros como se indica en la tabla 5.

**Tabla N° 5. Crecimiento micelial del hongo (mm)**

Tratamientos	Medias
T1 (AE <i>Miristica fragrans</i> 2mL/L)	0,00 A
T3 (AE <i>Thymus vulgaris</i> + <i>Mentha piperita</i> 2mL/L)	32,90 A B
T2 (EV <i>Moringa oleifera</i> 2mL/L)	41,10 B C
T4 (Testigo absoluto sin aplicación)	81,30 C

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Kruskal Wallis al 5% de significancia

Grisales, 2022

Se encontró diferencias estadísticas significativas en el experimento entre los tratamientos y la inhibición del hongo, se observó que el T1 (AE *Miristica fragrans*) registró un crecimiento de 0,00 mm impidiendo el desarrollo *in vitro* del hongo, el T3 (AE *Thymus vulgaris* + *Mentha piperita*) presentó resultados similares al T2 (EV *Moringa oleifera*) con 32,90 mm y 41,10 mm respectivamente, que comparados con el T4 (Testigo absoluto sin aplicación) con cubrimiento total de la caja Petri constituyen una alternativa a estudiarse con mayor profundidad, empleando concentraciones más altas que permitan la inhibición completa del crecimiento del hongo.

### Producción de esporas

Las esporas de *M. fijiensis* se cuantificaron usando a cámara de Neubauer a los 7 días después de inocular el fitopatógeno en las cajas Petri con los tratamientos biofungicidas y se efectuó la fórmula de producción de esporas por mm<sup>3</sup>, registrando las medias en la Tabla 6.

**Tabla N° 6. Producción de esporas**

Tratamientos	Medias	
T1 (AE <i>Miristica fragrans</i> 2mL/L)	0,00	A
T3 (AE <i>Thymus vulgaris</i> + <i>Mentha piperita</i> 2mL/L)	8,08	A B
T2 (EV <i>Moringa oleifera</i> 2mL/L)	20,88	B C
T4 (Testigo absoluto sin aplicación)	106,46	C

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Kruskal Wallis al 5% de significancia

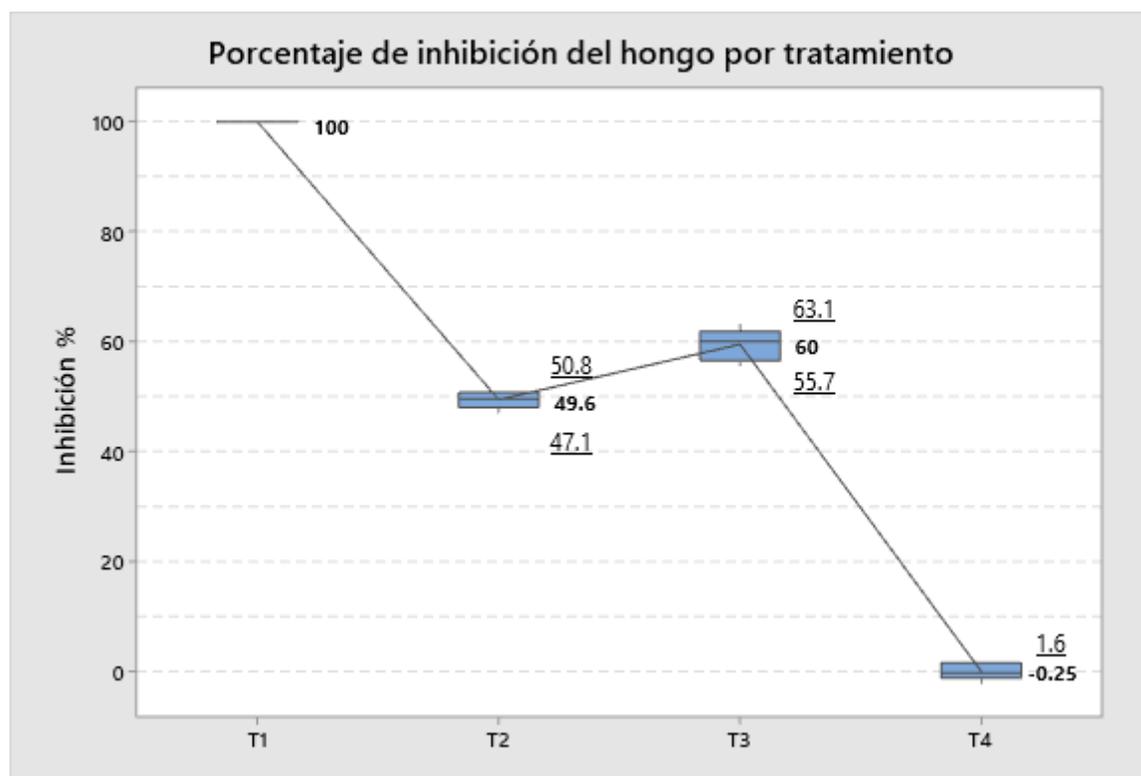
Grisales, 2022

Se encontró diferencias estadísticas significativas en la producción de esporas y se relacionó directamente con el crecimiento del micelio del fitopatógeno en el agar envenenado siendo consecuente con lo observado en el T1 (AE *Miristica fragrans*) no registró esporas, en cambio el T3 (AE *Thymus vulgaris* + *Mentha piperita*) y T2 (EV *Moringa oleifera*) tuvieron presencia con 202 mm<sup>3</sup> y 522 mm<sup>3</sup> respectivamente, siendo el T4 (Testigo absoluto sin aplicación) el tratamiento con la presencia de esporas

significativamente elevada 2664 mm<sup>3</sup> ante la ausencia de agregados de acción anti fúngica en su composición.

### Porcentaje de inhibición del hongo

El efecto de los tratamientos biofungicidas, se relacionó directamente al crecimiento micelial de *M. fijiensis* en condiciones *in vitro*, al comparar el desarrollo del testigo absoluto favorecido por la naturaleza del medio de cultivo PDA proporcionándole las condiciones adecuadas de crecimiento y las demás cepas fúngicas sometidas al experimento. Las medias del porcentaje de inhibición están indicadas en el Anexo 2.



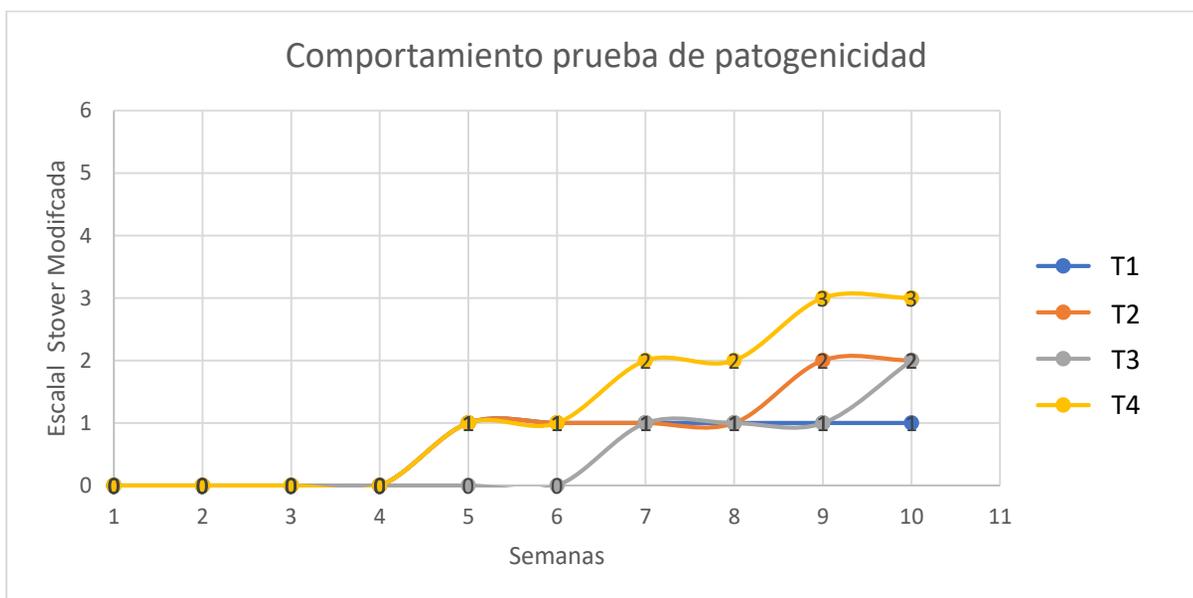
Anexo N° 2. Gráfico de cajas Porcentaje de inhibición del hongo por tratamiento  
Elaborado por: Grisales, 2022

En los datos analizados, se encontró que el porcentaje de inhibición de T1(AE *Miristica fragrans*) se mostró constante con el 100%, siendo consecuente con los datos recolectados de crecimiento del hongo y la producción de esporas en el tratamiento. Los demás tratamientos con biofungicidas presentaron leves diferencias en sus porcentajes de inhibición máximos y mínimos, el T2 (EV *Moringa oleifera*) 50.8% -

47.1% y T3 (AE *Thymus vulgaris* + *Mentha piperita*) 63.1% - 55.7. Con respecto al T4, al ser el testigo absoluto sin tratamiento, los porcentajes de inhibición fueron escasos; sin embargo, los datos aportados fueron de importancia para determinar los valores porcentuales de los biofungicidas en estudio.

### Prueba de patogenicidad del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet aplicando los tratamientos biofungicidas.

La prueba de patogenicidad realizada en la plantilla de variedad Williams proporciono los datos correspondientes a la sintomatología de la enfermedad causada por *M. fijiensis* durante 10 semanas, datos que fueron establecidos de acuerdo a la escala de Stover modificada por Gauhl. Los primeros indicios se registraron en la semana 5 en el estado 1 de la enfermedad, al presentarse pequeñas estrías de color rojizo en el envés de las hojas que aumentaron su tamaño al transcurrir las semanas adquiriendo una coloración café oscuro con halo clorótico. El comportamiento de la enfermedad en la prueba de patogenicidad está indicado en el Anexo 3.



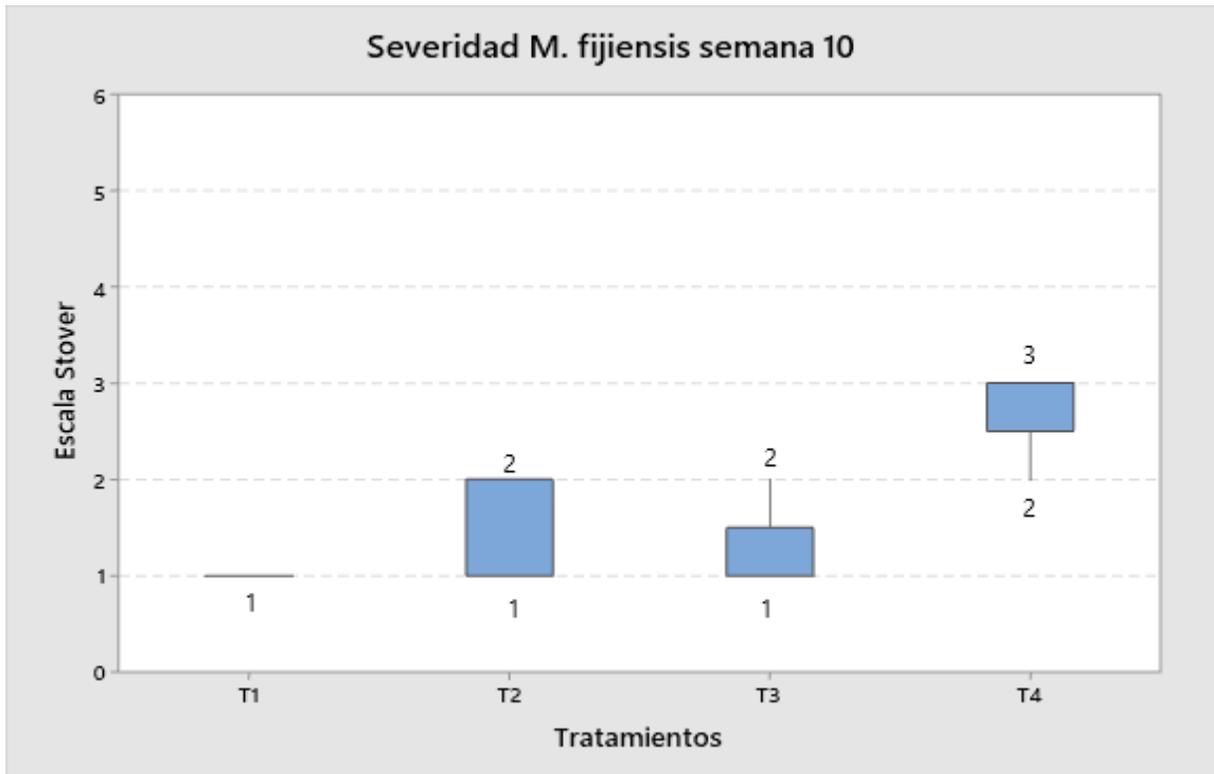
Anexo N° 3. Gráfico comportamiento prueba de patogenicidad  
Elaborado por: Grisales, 2022

En el gráfico se observa la evolución de los síntomas de la enfermedad en las plantas por tratamiento, donde T1 (AE *Miristica fragrans*) se ubicó en la escala 1

durante las semanas 7 a la 10, de esta manera se establece que el tratamiento tuvo efecto positivo en el manejo de la enfermedad dilatando la presencia de síntomas en las hojas, por su parte el T2 (EV *Moringa oleifera*) presento en la semana 5 una severidad de 1 en la escala, hasta la semana 9-10 que paso a un grado 2. Así mismo el T3 (AE *Thymus vulgaris* + *Mentha piperita*) inicio con estado 1 en la semana 7 y posteriormente avanzo al grado 2 en las semanas 9-10. Por último, el T4 testigo absoluto, favorecido por las condiciones ambientales, la presencia de inoculo del fitopatógeno y la ausencia de tratamiento, presento los primeros síntomas de la enfermedad en escala 1 desde la semana 4, que permanecieron en las semanas 5-6; más adelante en las semanas 7-8 alcanzo grado 2. Finalmente, en las semanas 9-10 reporto un grado 3 en la escala de severidad de la enfermedad.

#### **Nivel de daño alcanzado por el hongo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en las plantas de banano después de los tratamientos.**

Los tratamientos biofungicidas empleados en la plantilla de banano variedad Williams fueron evaluados con el método Stover modificado por Gauhl a las 10 semanas de aplicación con la finalidad de constatar la severidad del hongo *M. fijiensis* y el grado de afectación en los tejidos del vegetal en experimento, cabe resaltar que aunque las plantas se encuentran en etapa vegetativa la afectación realizada por el hongo influye tanto en la etapa reproductiva como en la productiva de la planta al intervenir en la calidad de la fruta . El nivel de daño alcanzado por el fitopatógeno está indicado en el Anexo 4.



Anexo N° 4. Gráfico de cajas severidad M. fijiensis semana 10  
Elaborado por: Grisales, 2022

En el gráfico se aprecia la severidad de la enfermedad en las plantas al finalizar la aplicación de los biofungicidas por tratamiento en la semana 10 y la variación en la escala, en consecuencia, el T1 (*AE Miristica fragrans*) presentó menos del 1 % del área foliar afectada, es decir que presentó un valor inferior a 10 estrías; valor relacionado directamente al efecto del tratamiento. Con respecto al T2 (*EV Moringa oleifera*) y el T3 (*AE Thymus vulgaris + Mentha piperita*) obtuvieron resultados entre el 1 al 5% de área foliar afectada con estrías rojizas visibles tanto en el haz como el envés de las hojas. Por último, el T4 testigo absoluto alcanzó el grado 3 en la escala con un 6 a 15% del área foliar afectada, con aumento en el grosor y largo de las estrías, que si bien son valores medios, deben ser analizados para implementar los programas de manejo de sigatoka, ya que contribuyen al desarrollo y la posterior dispersión del inoculo del fitopatógeno en otras hojas y plantas vecinas.

### Estado evolutivo final de sigatoka negra

En los tratamientos analizados en campo se recolectaron los valores correspondientes a existencia de lesiones en las hojas 3, 4 y 5 de la planta para determinar la presión actual de la enfermedad. Los datos registrados se presentan a continuación:

**Tabla 7. Estado evolutivo final de Sigatoka negra**

Tratamientos	H3	H4	H5	Total
1	0	0	76.8	76.8
2	38.4	32	76.8	147.2
3	9.6	32	78.8	118.4
4	38.4	112	179.2	329.4

Grisales, 2022

En la tabla se observa el estado evolutivo total de sigatoka por tratamiento, donde T1 (*AE Miristica fragrans*) presenta una presión baja de la enfermedad, con ausencia de lesiones en las hojas 3 y 4 de la planta. El T2 (*EV Moringa oleifera*) y T3 (*AE Thymus vulgaris + Mentha piperita*) registraron valores de presión baja de sigatoka, aunque con lesiones en las hojas 3, 4 y 5 de la planta que la acercan a una presión moderada. Por último, el T4 testigo absoluto obtuvo datos de presión alta de la enfermedad, con lesiones pequeñas en hoja 3 y 4, mientras que en hoja 5 la severidad aumento y con ello el número y tamaño de estrías; en consecuencia, debe realizarse aplicación de productos para mantener el buen estado fitosanitario de las plantas de este tratamiento.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación evaluó la eficiencia de diferentes biofungicidas sobre *Mycosphaerella fijensis* bajo condiciones controladas, además se llevó a cabo una prueba de patogenicidad para establecer la severidad de la enfermedad in vivo. Producto del experimento se establece lo siguiente:

De acuerdo a las observaciones realizadas en este trabajo del fitopatógeno *M. fijensis*, cultivado en cajas Petri con medio PDA; las características mencionadas sobre el aspecto y coloración del micelio son similares a las encontradas por Drenth & Guest (2016), que va desde un color blanco grisáceo a blanco rosado con una consistencia algodonosa, estas variaciones se relacionan con la humedad y temperatura en el desarrollo del hongo. Los conidios obtenidos de *M. fijensis*, tienen una coloración hialina, forma alargada-cilíndrica ligeramente curvos más delgados en el ápice y con septos presentes tal y como lo describe Isaza (2016), en los que también se indica la variación en el tamaño y las ramificaciones de las hifas causados por las condiciones ambientales y la procedencia del material vegetal.

Bajo condiciones in vitro los tratamientos sometidos a experimento, se obtuvieron los valores de las variables de crecimiento micelial y producción de esporas, al realizar el tratamiento de los datos con pruebas estadísticas se encontraron diferencias significativas que demuestran que los biofungicidas influyeron en el desarrollo del fitopatógeno. Se observó que los tratamientos con aceites esenciales inhibieron el crecimiento del hongo, mientras que sin la aplicación encontraron un medio adecuado para la formación de colonia. Por ende coincide con Delgado et al. (2020), quien expresa que los aceites y extractos de origen vegetal contienen metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, que son empleados como defensa contra patógenos. Por lo cual se acepta la hipótesis alternativa el aceite esencial de nuez moscada y demás biofungicidas aplicados permitirán el control de sigatoka negra.

La prueba de patogenicidad realizada en plantilla de tres meses de edad en campo, con la aplicación de los tratamientos con frecuencia semanal; determino la evolución de los síntomas de la enfermedad. La evaluación de los tratamientos indico que el T1 en el que se empleó el aceite esencial de nuez moscada logro ampliar el número de semanas libre de síntomas característicos de estrías de la enfermedad hasta la semana 7, resultado que concuerda con lo mencionado por Klein et al. (2017) quien describe que los aceites esenciales proporcionan un efecto protector y de resistencia a largo plago en las plantas contra los patógenos inclusive contra estrés biótico y abiótico.

Al analizar el nivel de daño alcanzado por *M. fijensis* en las plantas posterior a los tratamientos se evidencio diferencias en el experimento y el nivel de presión que ejerció el fitopatógeno sobre las plantas en estudio. Los datos obtenidos prueban el efecto de control positivo del tratamiento con aceite de nuez moscada, ante la ausencia de lesiones en las hojas 3 y 4 de la planta; resultados acordes con Dene (2018) y Le Mire (2016), quienes expresan que el uso de aceites esenciales y extractos vegetales como biofungicidas tienen una acción duradera fortaleciendo las plantas al proporcionar protección durante un periodo mas prolongado. El tratamiento con aceite de menta-tomillo y extracto de moringa si bien presentaron lesiones en las hojas 3-4 y 5 estan ubicadas en la escala 1 con una baja presión de la enfermedad

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **Conclusiones**

De acuerdo con los datos obtenidos en el ensayo experimental realizado se puede concluir lo siguiente:

Las características fenotípicas de los hongos en condiciones in vitro presentan variaciones principalmente en la coloración del micelio, que se ve afectado por los cambios en la temperatura y las variaciones de ingredientes activos empleados para su control.

La eficiencia de los biofungicidas como aceites esenciales y extractos vegetales en condiciones in vitro es promisorio, ya que presentan una actividad inhibitoria del crecimiento de la sigatoka negra que va desde 50 a 100%

La prueba de patogenicidad demostró que la aplicación de biofungicidas en plantas favorecen el fortalecimiento de los mecanismos de resistencia de la planta, impidiendo por un periodo de tiempo más prolongado la incidencia de la enfermedad.

Los niveles de daño de *M. Fijiensis* son bajos en los tratamientos con aceites esenciales ya que se disminuye el inóculo de la enfermedad y las lesiones en las hojas más jóvenes de la planta.

### **Recomendaciones**

Considerando los resultados obtenidos en esta investigación se puede recomendar:

Realizar la identificación de las especies patogénicas en estudio con técnicas moleculares que proporcionen información filogenética más acertada sobre la enfermedad.

Incluir los tratamientos con biofungicidas dentro del manejo integrado fitosanitario de la plantilla de banano.

Evaluar diferentes dosis de los tratamientos biofungicidas para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias que permitan el control de *M. Fijiensis*.

Realizar pruebas de patogenicidad con variaciones en la frecuencia de aplicación de biofungicidas durante las etapas vegetativa, desarrollo y productivas de la planta.

Analizar el comportamiento evolutivo de la enfermedad con la aplicación de biofungicidas vs tratamientos convencionales.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Agrios, G. N. (2005). *Fitopatología*. Limusa.
- Aguirre, S. E., Piraneque, N. V., & Rodríguez, J. (2015). Relationship between the nutritional status of banana plants and black sigatoka severity in the Magdalena region of Colombia. *Agronomía Colombiana*, 33(3), 348-355. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n3.51900>
- Ahmadu, T., Ahmad, K., Ismail, S. I., Rashed, O., Asib, N., & Omar, D. (2020). Antifungal efficacy of *Moringa oleifera* leaf and seed extracts against *Botrytis cinerea* causing gray mold disease of tomato *Solanum lycopersicum* L.). *Brazilian Journal of Biology*, 81, 1007-1022. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.233173>
- Alexandersson, E., Mulugeta, T., Lankinen, Å., Liljeroth, E., & Andreasson, E. (2016). Plant Resistance Inducers against Pathogens in Solanaceae Species—From Molecular Mechanisms to Field Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1673. <https://doi.org/10.3390/ijms17101673>
- Alvarez, E., Pantoja, A., Gañán, L., & Ceballos, G. (2013). La Sigatoka negra en plátano y banano. Guía para el reconocimiento y manejo de la enfermedad, aplicado a la agricultura familiar. *CIAT*, 6.
- Arias-Londoño, M. A., Zapata-Ocampo, P. A., Mosquera-Arevalo, Á. R., Sanchez-Torres, J. D., Atehortua-Garcés, L., Arias-Londoño, M. A., Zapata-Ocampo, P. A., Mosquera-Arevalo, Á. R., Sanchez-Torres, J. D., & Atehortua-Garcés, L. (2019). Antifungal protein determination for submerged cultures of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Ganodermataceae) with activity over the

phytopathogen fungus *Mycosphaerella fijiensis* (Mycosphaerellaceae).  
*Actualidades Biológicas*, 41(111), 53-64.  
<https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n110a04>

Asamblea Nacional. (2017, junio 27). *Ley Orgánica de sanidad Agropecuaria*.  
[https://lexis.ueb.edu.ec/WebTools/LexisFinder/DocumentVisualizer/DocumentVisualizer.aspx?id=AGROPEC-LEY\\_ORGANICA\\_DE\\_SANIDAD\\_AGROPECUARIA&query=](https://lexis.ueb.edu.ec/WebTools/LexisFinder/DocumentVisualizer/DocumentVisualizer.aspx?id=AGROPEC-LEY_ORGANICA_DE_SANIDAD_AGROPECUARIA&query=)

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Banani, H., Olivieri, L., Santoro, K., Garibaldi, A., Gullino, M. L., & Spadaro, D. (2018). Thyme and Savory Essential Oil Efficacy and Induction of Resistance against *Botrytis cinerea* through Priming of Defense Responses in Apple. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(2), E11. <https://doi.org/10.3390/foods7020011>

Batista, A. B., Oliveira, J. T. A., Gifoni, J. M., Pereira, M. L., Almeida, M. G. G., Gomes, V. M., Cunha, M. D., Ribeiro, S. F. F., Dias, G. B., Beltramini, L. M., Lopes, J. L. S., Grangeiro, T. B., & Vasconcelos, I. M. (2014). New Insights into the Structure and Mode of Action of Mo-CBP3, an Antifungal Chitin-Binding Protein of *Moringa oleifera* Seeds. *PLOS ONE*, 9(10), e111427.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111427>

Brito, F., Fraaije, B., & Miller, R. (2015). Sigatoka Disease Complex of Banana in Brazil: Management Practices and Future Directions. *Outlooks on Pest Management*, 26. [https://doi.org/10.1564/v26\\_apr\\_08](https://doi.org/10.1564/v26_apr_08)

- Cabrera, J. B. Z., Guerrero, J. N. Q., & Batista, R. M. G. (2020). La producción de banano en la Provincial de El Oro y su impacto en la agrobiodiversidad. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(3), 189-195.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1), 3-41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Capa Benítez, L. B., Alaña Castillo, T. P., & Benítez Narváez, R. M. (2016). IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN DE BANANO ORGÁNICO.: CASO: PROVINCIA EL ORO, ECUADOR. *Revista Universidad y Sociedad*, 8(3), 64-71.
- Cavero, P., Hanada, R., Gasparotto, L., Netto, R., & De Souza, J. (2015). Biological control of banana black Sigatoka disease with Trichoderma. *Ciencia Rural*, 45, 951-957. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140436>
- Cedeño, G., Suarez Capello, C., Vera Coello, D., Fadda, C., Jarvis, D., & de Santis, P. (2017). Detección temprana de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* en genotipos locales de Musáceas en Ecuador. *Scientia Agropecuaria*, 8(1), 29-42. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.03>
- Chávez, A., Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Castellanos-Galeano, F. J., Álvarez-Barreto, C. I., & Pacheco-Vargas, G. (2017). Isolation and partial characterization of starch from banana cultivars grown in Colombia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 240-246. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.024>
- Chraibi, M., Fadil, M., Farah, A., Lebrazi, S., & Fikri-Benbrahim, K. (2021). Antimicrobial combined action of *Mentha pulegium*, *Ormenis mixta* and *Mentha piperita* essential oils against *S. aureus*, *E. coli* and *C. tropicalis*: Application of mixture

design methodology. *LWT*, 145, 111352.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111352>

Coello, C. D., Cevallos, J. H. A., Álvarez, A. E. B., Galeas, M. M. P., Macías, P. F. Y., & Macías, E. R. R. (2017). Evaluación del crecimiento y producción de biomasa de dos cepas del género *Pleurotus* spp., cultivadas en un medio agar con diferentes sustratos. *Revista Ciencia y Tecnología*, 10(2), 33-39.

Cuéllar, A., Álvarez Cabrera, E., & Castaño Zapata, J. (2011). Evaluación de resistencia de genotipos de plátano y banano a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* Morelet.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(1), 5853-5865.

Del Cioppo Morstadt, J., & Salazar, R. (2015). *ECUADOR: EXPORTACIÓN DE BANANO (Musa sp.) ESTUDIO SECTORIAL DEL BANANO ECUATORIANO DE EXPORTACIÓN.*

Delgado-Oramas, B. P., Marquetti, I. G., Hernández, M. G. R., & Pérez, O. P. (2020). La resistencia inducida por productos derivados de plantas: Alternativa para el manejo de plagas agrícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 35(3), Article 3. <http://mail.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/1105>

Deliopoulos, T., Kettlewell, P. S., & Hare, M. C. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection*, 29(10), 1059-1075. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.011>

Dènè, L. (2018). *Plant extracts: Antimicrobial and antifungal activity and appliance in plant protection (Review).*

Diáñez, F., Santos, M., Parra, C., Navarro, M. J., Blanco, R., & Gea, F. J. (2018).

- Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. *Letters in Applied Microbiology*, 67(4), 400-410. <https://doi.org/10.1111/lam.13053>
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2004). Chemical Composition, Antimicrobial and In Vitro Antioxidant Properties of *Monarda citriodora* var. *Citriodora*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*, *Pelargonium* sp. And *Thymus zygis* Oils. *Journal of Essential Oil Research*, 16(2), 145-150. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698679>
- Drenth, A., & Guest, D. I. (2016). Fungal and Oomycete Diseases of Tropical Tree Fruit Crops. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 373-395. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095944>
- El Hadrami, A., Kone, D., & Lepoivre, P. (2005). Effect of Juglone on Active Oxygen Species and Antioxidant Enzymes in Susceptible and Partially Resistant Banana Cultivars to Black Leaf Streak Disease. *European Journal of Plant Pathology*, 113(3), 241-254. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-8675-y>
- Elbehri, A., Calberto, G., Staver, C., Hospido, A., & Skully, D. (2015). *Cambio climático y sostenibilidad del banano en el Ecuador: Evaluación de impacto y directrices de política*. 198.
- Escobar, L., Guzmán-Quesada, M., Sandoval-Fernández, J. A., & Gómez-Lim, M. A. (2015). Comparative analysis of the in vitro and in planta secretomes from *Mycosphaerella fijiensis* isolates. *Fungal Biology*, 119(6), 447-470. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.01.002>
- FAO. (2020). *Análisis del mercado del banano: Resultados preliminares 2019*. 16.

- Gifoni, J. M., Oliveira, J. T. A., Oliveira, H. D., Batista, A. B., Pereira, M. L., Gomes, A. S., Oliveira, H. P., Grangeiro, T. B., & Vasconcelos, I. M. (2012). A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. *Biopolymers*, *98*(4), 406-415. <https://doi.org/10.1002/bip.22068>
- Gonzabay, R. (2017). Cultivo del banano en el Ecuador. *Revista AFESE*, *58*(58), Article 58. <http://www.revistaafese.org/ojsAfese/index.php/afese/article/view/317>
- Gullino, M., & Tavella, L. (2020). *Chemical and Natural Pesticides in IPM: Side-Effects and Application* (pp. 441-454). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5_15)
- Gupta, A. D., Bansal, V. K., Babu, V., & Maithil, N. (2013). Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *11*(1), 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2012.12.001>
- Gutiérrez-Jiménez, E., Pedroza-Sandoval, A., Martínez-Bolaños, L., Samaniego-Gaxiola, J. A., García-González, F., Gutiérrez-Jiménez, E., Pedroza-Sandoval, A., Martínez-Bolaños, L., Samaniego-Gaxiola, J. A., & García-González, F. (2018). Efecto de aceites naturales contra *Mycosphaerella fijiensis* en condiciones in vitro y detección de fitoquímicos activos. *Revista mexicana de fitopatología*, *36*(1), 141-150. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1707-4>
- Hidalgo, W., Chandran, J. N., Menezes, R. C., Otálvaro, F., & Schneider, B. (2016). Phenylphenalenones protect banana plants from infection by *Mycosphaerella fijiensis* and are deactivated by metabolic conversion. *Plant, Cell & Environment*, *39*(3), 492-513. <https://doi.org/10.1111/pce.12630>
- INEC. (2019). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC)*

2018. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2018/Presentacion%20de%20principales%20resultados.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2018/Presentacion%20de%20principales%20resultados.pdf)

- Isaza, R. E. A., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C. F., Jong, T. V. de, Vries, I. de, Dietrich, R., Farmer, A. D., Ferreira, C. F., Garcia, S., Guzman, M., Hamelin, R. C., Lindquist, E. A., Mehrabi, R., Quiros, O., Schmutz, J., Shapiro, H., ... Kema, G. H. J. (2016). Combating a Global Threat to a Clonal Crop: Banana Black Sigatoka Pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (Synonym *Mycosphaerella fijiensis*) Genomes Reveal Clues for Disease Control. *PLOS Genetics*, 12(8), e1005876. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005876>
- Jaramillo Aguilar, E., Barrezueta-Unda, S., Luna Romero, E., & Castillo Herrera, S. (2017). Efecto biofungicida del gel de Aloe vera sobre *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en Musa (AAA). *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 273-278. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.03.10>
- Jiménez, G. E. P., Zurita, I. N., & Álvarez, J. C. E. (2020). Análisis del impacto tributario y contable por las variaciones del precio de la caja de banano en los productores del cantón Machala, Ecuador. *Dominio de las Ciencias*, 6(Extra 1), 396-428.
- Klein, J. D., Firmansyah, A., Panga, N., Abu-Aklin, W., Dekalo-Keren, M., Gefen, T., Kohen, R., Shalev, Y. R., Dudai, N., Mazor, L., Klein, J. D., Firmansyah, A., Panga, N., Abu-Aklin, W., Dekalo-Keren, M., Gefen, T., Kohen, R., Shalev, Y. R., Dudai, N., & Mazor, L. (2017). Seed treatments with essential oils protect radish seedlings against drought. *AIMS Agriculture and Food*, 2(4), 345-353. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2017.4.345>

- Koppert, B. S. (2021). *Nopath*. <https://www.koppert.ec/nopath/>
- Kozłowska, M., Gruczyńska, E., Ścibisz, I., & Rudzińska, M. (2016). Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *Food Chemistry*, 213, 450-456. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.102>
- Kraithong, S., & Issara, U. (2021). A strategic review on plant by-product from banana harvesting: A potentially bio-based ingredient for approaching novel food and agro-industry sustainability. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.06.004>
- Le Mire, G., Luan Nguyen\*, M., Fassotte, B., du Jardin, P., Verheggen, F., Delaplace\*\*, P., & Haissam Jijakli\*\*, M. (2016). Review: Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. *BASE*. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.12717>
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). Chapter Two—The Evolution of Fungicide Resistance. En S. Sariaslani & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 90, pp. 29-92). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>
- Marcano, I.-E., Díaz-Alcántara, C.-A., Seco, V., Urbano, B., & González-Andrés, F. (2016). Induced Systemic Resistance Could Explain the Reduction in the Incidence of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) in Banana Plants Inoculated with Bacteria Isolated from Banana Tree Roots in the Dominican Republic. En F. González-Andrés & E. James (Eds.), *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction* (pp. 155-170). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6_14)

- Meena, B. R., Meena, S., Chittora, D., & Sharma, K. (2021). Antifungal efficacy of *Thevetia peruviana* leaf extract against *Alternaria solani* and characterization of novel inhibitory compounds by Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 25, 100914. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100914>
- Moutassem, D., Belabid, L., Bellik, Y., Ziouche, S., & Baali, F. (2019). Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of *Fusarium wilt* and inducing systemic resistance in chickpea seedlings. *Plant Protection Science*, 55 (2019)(No. 3), 202-217. <https://doi.org/10.17221/134/2018-PPS>
- Narasimhan, B., & Dhake, A. S. (2006). Antibacterial Principles from *Myristica fragrans* Seeds. *Journal of Medicinal Food*, 9(3), 395-399. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.9.395>
- Narváez, F. J., Miranda, S. B., Vásquez, F. M. F.-F., Chévez, M. M., Mosquera, J. A. N., & Llaguno, S. N. S. (2017). Potencial antifúngico de *Citrus sinensis* y *Citrus nobilis* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya. *Revista Ciencia y Tecnología*, 10(1), 41-46.
- Noar, R. D., & Daub, M. E. (2016). Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. *BMC Genomics*, 17(1), 690. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3031-5>
- Oiram, F., Lopes, M. M. de A., Matias, M. L., Braga, T. R., Aragão, F. A. S. de, Silveira, M. R. S. da, Oliveira, M. M. M. T. de, & Silva, E. de O. (2019). Shelf-life estimation and quality of resistant bananas to black leaf streak disease during ripening. *Scientia Horticulturae*, 251, 267-275.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.029>

Patil, S. M., Ramu, R., Shirahatti, P. S., Shivamallu, C., & Amachawadi, R. G. (2021).

A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. *Heliyon*, 7(5), e07054.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07054>

Pennisi, E. (2010). Armed and dangerous. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5967), 804-

805. <https://doi.org/10.1126/science.327.5967.804>

Rodríguez, P. A., & Cayón, G. (2008). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana*, 26(2), 256-265.

S. V. A. Organics. (2021). *Nutmeg Essential Oil, ORGANIC*. SVA Organics.

<https://www.svanaturals.com/nutmeg-essential-oil-organic.html>

Sánchez Timm, E., Hidalgo Pardo, L., Pacheco Coello, R., Chávez Navarrete, T.,

Navarrete Villegas, O., & Santos Ordóñez, E. (2016). Identification of

Differentially-Expressed Genes in Response to *Mycosphaerella fijiensis* in the

Resistant *Musa* Accession «Calcutta-4» Using Suppression Subtractive

Hybridization. *PloS One*, 11(8), e0160083.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160083>

Satmi, F. R. S., & Hossain, M. A. (2016). In vitro antimicrobial potential of crude extracts

and chemical compositions of essential oils of leaves of *Mentha piperita* L native

to the Sultanate of Oman. *Pacific Science Review A: Natural Science and*

*Engineering*, 18(2), 103-106. <https://doi.org/10.1016/j.psra.2016.09.005>

Sepúlveda, L. (2016). Caracterización fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su

relación con la sensibilidad a fungicidas en Colombia. *Revista mexicana de*

*fitopatología*, 34(1), 1-21. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507.8>

Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 21-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>

Silveira, L. I., Bibiano, L. B. J., Silva, G. F. da, Hanada, R. E., & Mizubuti, E. S. G. (2014). Baseline sensitivity of Brazilian *Mycosphaerella fijiensis* isolates to protectant and systemic fungicides. *Tropical Plant Pathology*, 39, 172-177. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000200008>

Theresa, M., & Radhakrishnan, E. K. (2021). Chapter 11—Microbial biocontrol formulations for commercial applications. En J. White, A. Kumar, & S. Droby (Eds.), *Microbiome Stimulants for Crops* (pp. 179-192). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822122-8.00025-X>

Vilhena, R. de O., Marson, B. M., Budel, J. M., Amano, E., Messias-Reason, I. J. de T., & Pontarolo, R. (2019). Morpho-anatomy of the inflorescence of *Musaxparadisiaca*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(2), 147-151. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.01.003>

Volcy, C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115.

Walters, D. R., & Fountaine, J. M. (2009). Practical application of induced resistance to plant diseases: An appraisal of effectiveness under field conditions. *The Journal of Agricultural Science*, 147(5), 523-535. <https://doi.org/10.1017/S0021859609008806>

Yu, Z., Tang, J., Khare, T., & Kumar, V. (2020). The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue? *Fitoterapia*, 140, 104433. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104433>

## ANEXOS

**Extraction Method:** Steam Distillation

**Ingredients:** Nutmeg Oil (Myristica Fragrans)

**Suggested use:**

**Topical:** SVA Nutmeg Oil is a great oil which comes with multiple benefits. Add few drops to a carrier oil and massage regularly for an enhanced body function and healthy muscles. It helps skin glow and hair shine. The natural properties of nutmeg oil are healing and therapeutic for scalp and skin.

**Aromatherapy:** The unique, woody and spicy scent of Nutmeg Oil when diffused or added to bath products help you relax instantly. It aids in better sleep. The enchanting aroma creates a cozy and joyful ambience. Also helps in eradicating bad odour.

**Deoderiser:** Add few drops to water and spray for deoderising.

**Caution:**  
If pregnant, nursing or under a doctor's care, consult physician. Dilute with carrier oil for topical use. Discontinue use if irritation occurs. Avoid contact with eyes. Keep out of children's reach.



**Nutmeg Oil**

Myristica Fragrans

Premium Therapeutic Grade  
100% Pure and Natural

Origin: India

1 fl Oz / 30 ml

**Our Vision:**  
SVA is committed to provide you with the highest quality Natural Oils and Extracts in the market, to help you achieve natural solutions for your health and well being.

**Storage:** Store in a cool, dry place.

**Distributed by:**  
Sri Venkatesh Aromas  
Plot No. 2,3,4 Industrial Area,  
Pratap Pura, Post Orchna,  
Distt Tikamgarh,  
Madhya Pradesh, India  
Website: www.svanaturals.com  
Email: info@svaorganics.com  
Call: +91-8586004906

NUTMEG OIL

Quality Assurance | No Additives | Therapeutic Grade

Anexo N° 5 Ficha técnica del aceite esencial de *Miristica fragrans* (S. V. A. Organics, 2021)

Ficha técnica

## Biofungicida



### NoPath Drench

No. Registro: RSCO-MEZC-FUNG-1303-X0013-052-032  
Certificado OMRI: KME-10226  
Certificado Control Union: C82176INP-02.2018

Última actualización: 3 de julio de 2019.

**Producto**

Fungicida agrícola

**Presentación**

Botella de 1 litro.

Aceite de tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	17.0
Equivalente a 168.73 g de i.a. / L a 20°C	
Aceite de menta ( <i>Mentha piperita</i> ) .....	15.0
Equivalente a 148.88 g de i.a. / L a 20°C	
Ingredientes inertes:	
Emulsificante, surfactante y solvente.....	68.0

**Objetivo**

Para el control de Damping off (*Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*). Incrementa la resistencia de la planta contra enfermedades.

**General**

NoPath Drench es un producto 100% natural a base de aceites esenciales de plantas aromáticas. Actúa como fungicida de contacto y ayuda en el manejo de enfermedades de suelo causadas por hongos, aplicando este producto por riego se mantiene contenida la infección y se previene la dispersión hacia otras plantas. NoPath Drench actúa bloqueando diversas rutas metabólicas y los procesos bioquímicos de los hongos lo que inhabilita su crecimiento y desarrollo. Aumenta la permeabilidad de la membrana citoplasmática del hongo, lo que causa su deshidratación llevando a las células a su muerte.

**Modo de empleo**

NoPath Drench puede ser utilizado en cualquier tipo de sistema de riego y de aplicación al drench.

**Preparación de la solución:**

- Agite el envase antes de usar.
- Abra el envase de NoPath Drench girando la tapa hasta romper el arillo de seguridad, con la misma tapa de forma invertida colóquela sobre el sello de seguridad presionando y girándola para romper totalmente el sello.
- Añada un poco de agua al tanque de aplicación.
- En un recipiente aparte, hacer una pre-mezcla con la cantidad a usar de NoPath Drench, remueva (nunca con las manos) hasta lograr una buena mezcla y vierta en el tanque.
- Después llene el tanque con agua mientras continúa agitando hasta lograr una mezcla homogénea.

Para conseguir un control efectivo, el producto debe llegar a las raíces de las plantas y el área donde se encuentre el patógeno.

**Dosis**

**Aplicaciones en drench:**

- 2 ml por litro de agua (0.2%), Realizar dos aplicaciones en drench a intervalo de 5 días; aplicar 50 ml de mezcla por planta.

**Aplicaciones en el sistema de riego:**

- Curativa baja 1 l por hectárea con intervalo de 7 días.
- Curativa alta 3 l por hectárea con intervalo de 7 días.
- Tiempo de reentrada a la zona tratada: 12 horas después de la aplicación.
- Intervalo de seguridad: días que deben transcurrir entre la última aplicación y la cosecha, sin límite.

**Compatibilidad**

No se use en combinación con otros productos plaguicidas. No mezclar con productos que contengan calcio.

Anexo N° 6 Ficha técnica de NoPath (Koppert, 2021)

Grado de severidad	Descripción de la severidad
0	Sin síntomas
1	<1% de área foliar afectada y/o hasta 10 estrías
2	1-5% de área foliar afectada
3	6-15% de área foliar afectada
4	16-33% de área foliar afectada
5	34-50% de área foliar afectada
6	>50% de área foliar afectada

**Anexo N° 7 Escala de Stover modificada por Gauhl para sigatoka negra**  
(Rodríguez & Cayón, 2008)

**Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
Crecimiento micelial (mm)	40	38.83	29.35	0.82	<0.0001
Producción de esporas	40	33.86	43.13	0.65	<0.0001

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas
Crecimiento micelial (mm)	1	10	0.00	0.00	0.00
Crecimiento micelial (mm)	2	10	41.10	1.20	41.00
Crecimiento micelial (mm)	3	10	32.90	2.13	32.50
Crecimiento micelial (mm)	4	10	81.30	1.25	81.50

**Trat. Ranks**

1	5.50	A		
3	15.50	A	B	
2	25.50		B	C
4	35.50			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H
Producción de esporas	1	10	0.00	0.00	0.00	36.59
Producción de esporas	2	10	20.88	1.70	21.00	
Producción de esporas	3	10	8.08	0.53	8.20	
Producción de esporas	4	10	106.46	0.40	106.50	

**Trat. Ranks**

1	5.50	A		
3	15.50	A	B	
2	25.50		B	C
4	35.50			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Anexo N° 8 Prueba de Shapiro Wilks y Kruskal Wallis**

Grisales, 2022

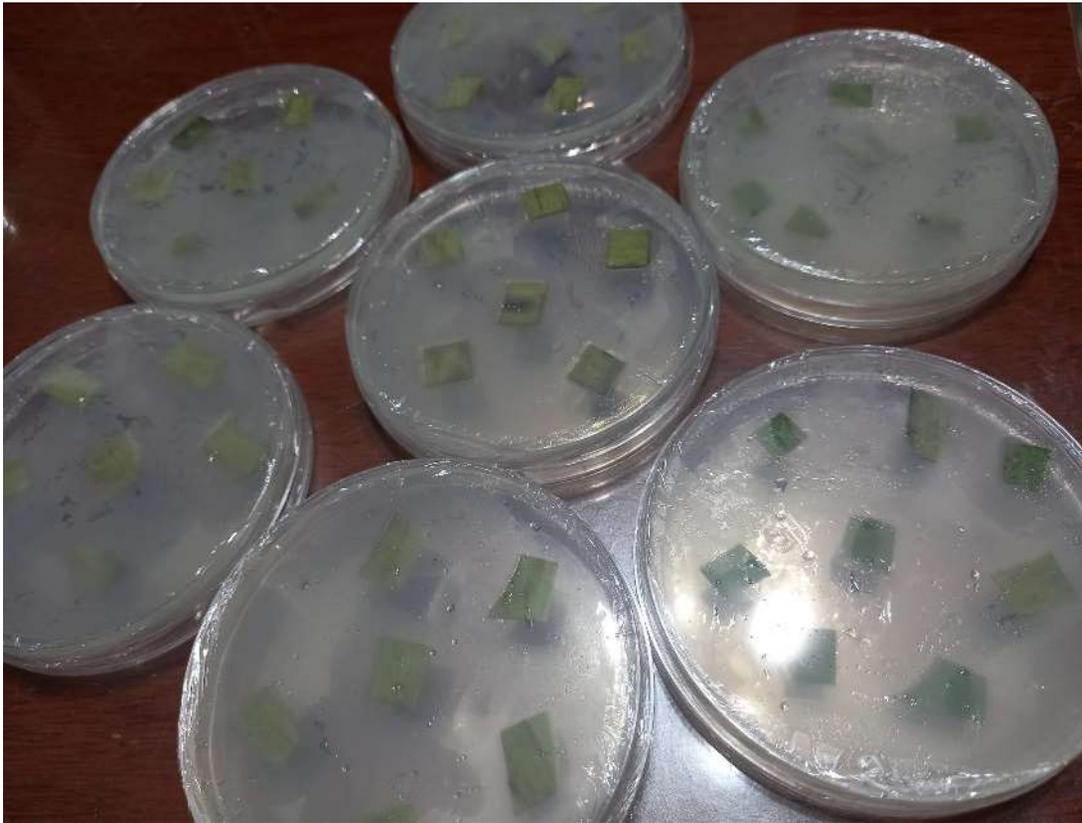
## APÉNDICES



Anexo N° 9 Recolección de material vegetal afectado por la enfermedad  
Grisales 2022



Anexo N° 10 Elaboración de extracto de semilla de moringa  
Grisales 2022



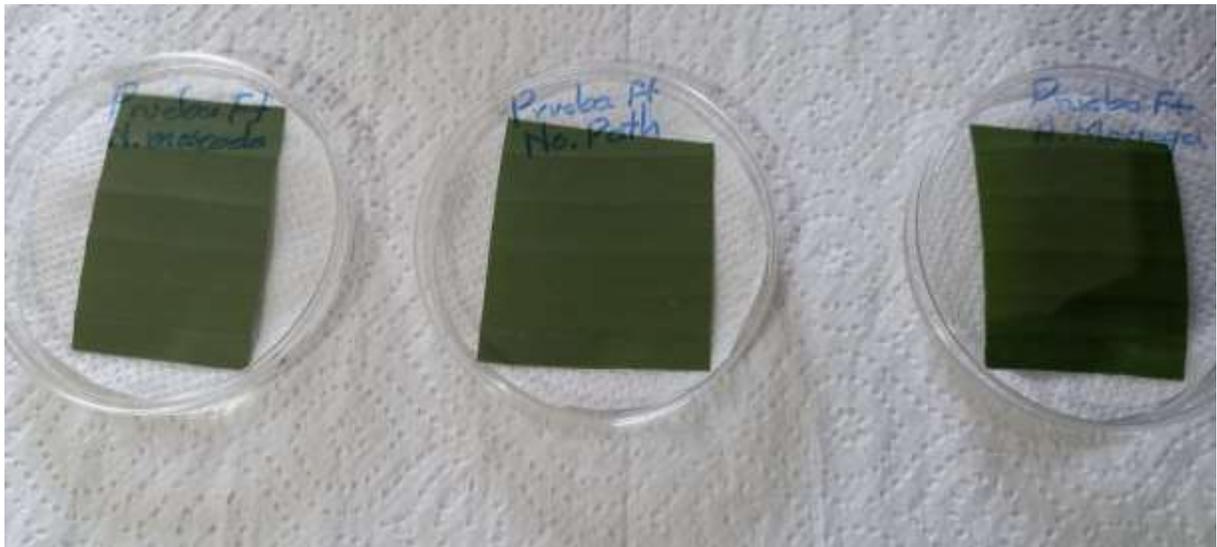
Anexo N° 11 Cultivo en PDA de material vegetal afectado por *M. fijiensis*  
Grisales 2022



**Anexo N° 12 Aislamientos *in vitro* de *M. fijiensis***  
Grisales 2022



**Anexo N° 13 Tratamientos biofungicidas *in vitro* sobre *M. fijiensis***  
Grisales 2022



**Anexo N° 14 Prueba de fitotoxicidad de los biofungicidas *en laboratorio***  
Grisales 2022



**Anexo N° 15 Aplicación de biofungicidas en plantilla de banano**  
Grisales 2022



**Anexo N° 16 Conteo de estrías en las planta sometidas a tratamiento**  
Grisales 2022



**Anexo N° 17 Análisis de evolución de la sigatoka negra en hojas 3-4 y 5 de la planta**  
Grisales 2022



**Anexo N° 18 Estrías características de la sigatoka negra**  
Grisales 2022

Balao, 28 de abril del 2022

AUTORIDADES  
SISTEMA DE POSGRADO  
UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR  
Guayaquil

De mis consideraciones:

Yo, **José Armando Carrión Andrade**, con cedula de ciudadanía N° 0701132979, en calidad de propietario de la banana "HACIENDA CAROLINA" ubicada en la provincia del Guayas, cantón Balao; dando a conocer por medio de la presente que **CERTIFICO LA CULMINACIÓN DEL TRABAJO TÉCNICO** por parte de la **Ing. ANGELICA LORENA GRISALES SALAZAR**, identificada con cedula de identidad N° 0961282829; en el estudio necesario para elaborar el proyecto de grado en el programa de **MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL** con el tema: "**EFICIENCIA DEL ACEITE *Myristica fragrans* Y DIFERENTES BIOFUNGICIDAS SOBRE *Mycosphaerella fijensis* Morelet EN *Musa* AAA, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**".

Autorizo a la **Ing. ANGELICA LORENA GRISALES SALAZAR** el presente respaldo exigido para continuar con el proceso en el sistema de posgrado.

Atentamente,



**JOSÉ ARMANDO CARRIÓN ANDRADE**

**Propietario Hacienda Carolina**

CC: 0701132979



Anexo N° 20 Copia de cédula del propietario del lugar de estudio.  
Grisales, 2022