



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**ANÁLISIS DE HONGOS QUITINOLÍTICOS AISLADOS DEL  
FILOPLANO DE BANANO PARA EL CONTROL  
POTENCIAL DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella  
fijensis* Morelet.)**

**TRABAJO EXPERIMENTAL**

Trabajo de titulación presentado como requisito para la  
obtención del título de  
**INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR  
PALACIOS SÁNCHEZ CHRISTIAN MAURICIO**

**TUTOR  
ING. MANCERO CASTILLO DANIEL ANDRES, PhD.**

**GUAYAQUIL-ECUADOR**

**2020**



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**APROBACIÓN DEL TUTOR**

Yo, MANCERO CASTILLO DANIEL ANDRES, docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: ANÁLISIS DE HONGOS QUITINOLÍTICOS AISLADOS DEL FILOPLANO DE BANANO PARA EL CONTROL POTENCIAL DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijensis* Morelet.), realizado por el estudiante PALACIOS SÁNCHEZ CHRISTIAN MAURICIO; con cédula de identidad N° 1207992189 de la carrera de INGENIERÍA AGRONÓMICA, Unidad Académica Guayaquil, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

Ing. Daniel Mancero Castillo, PhD

Guayaquil, 28 de septiembre del año 2020



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN**

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: “ANÁLISIS DE HONGOS QUITINOLÍTICOS AISLADOS DEL FILOPLANO DE BANANO PARA EL CONTROL POTENCIAL DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijensis* Morelet.)”, realizado por el estudiante PALACIOS SÁNCHEZ CHRISTIAN MAURICIO, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

---

Ing. Barreto Macías Arnaldo, M.Sc.  
**PRESIDENTE**

---

Ing. Valdez Rivera Danilo, M.Sc.  
**EXAMINADOR PRINCIPAL**

---

Ing. Mancero Castillo Daniel, Ph.D.  
**EXAMINADOR PRINCIPAL**

---

Ing. Baque Bustamante Wilmer, M.Sc.  
**EXAMINADOR SUPLENTE**

Guayaquil, 22 de octubre del 2020

### **Dedicatoria**

El presente trabajo de investigación está dedicado en primer lugar a Dios; mi guía, mi esperanza y mi salvador. Quiero dedicar también por todo el apoyo a mis padres el Dr. Fabián Palacios Cevallos y a la Lcda. Virginia Sánchez Peña que con ímpetu y esfuerzo me condujeron por el buen camino de la perseverancia. A mi amada esposa la Dra. Kenny Zambrano Maldonado por su apoyo incondicional en toda circunstancia. A ellos y a mis amigos más cercanos les dedico este trabajo previo a la obtención de mi título.

### **Agradecimiento**

Quiero agradecer a Dios en primer lugar, por poder permitir culminar con éxito mi primera investigación experimental. Agradezco personalmente al Dr. Daniel Mancero Castillo quien me superviso y aconsejo para obtener los mejores resultados posibles. Al Ing. Jacinto Augusto Marcillo Plaza quien en su momento me apoyo para el planteamiento de la presente investigación y por último a mi actual jefe el Dr. Jorge García Regalado quien me apoyo y motivo a realizar un buen trabajo.

### **Autorización de Autoría Intelectual**

Yo Palacios Sánchez Christian Mauricio, en calidad de autor del proyecto realizado, sobre “Análisis de hongos quitinolíticos aislados del filoplano de banano para el control potencial de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* Morelet.)” para optar el título de Ingeniero Agrónomo, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Guayaquil, septiembre 28 del 2020

**PALACIOS SÁNCHEZ CHRISTIAN MAURICIO**  
**C.I. 1207992189**

## Índice general

<b>PORTADA.....</b>	<b>1</b>
<b>APROBACIÓN DEL TUTOR .....</b>	<b>2</b>
<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>4</b>
<b>Agradecimiento .....</b>	<b>5</b>
<b>Autorización de Autoría Intelectual .....</b>	<b>6</b>
<b>Índice general .....</b>	<b>7</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>10</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>11</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>14</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Antecedentes del problema.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Planteamiento y formulación del problema .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.1 Planteamiento del problema .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.2 Formulación del problema .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Justificación de la investigación .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Delimitación de la investigación .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Objetivo general .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6 Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Estado del arte.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Bases teóricas .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.1 Generalidades del cultivo de banano .....</b>	<b>20</b>

2.2.1.1. Taxonomía y Origen.....	20
2.2.2 La importancia del banano en el Ecuador .....	21
2.2.3 La sigatoka negra .....	22
2.2.4 Combate biológico utilizando microorganismos quitinolíticos .....	23
2.3 Marco legal .....	25
2.3.2 Constitución de la República del Ecuador .....	25
2.3.3 Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria .....	25
2.3.4 Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria .....	26
3. Materiales y métodos .....	27
3.2 Enfoque de la investigación.....	27
3.2.2 Tipo de investigación .....	27
3.2.3 Diseño de investigación .....	27
3.3.1 Variables.....	27
3.3.1.1. <i>Variable independiente</i> .....	27
3.3.1.2. <i>Variable dependiente</i> .....	27
3.3.2 Tratamientos .....	28
3.3.3 Diseño experimental.....	28
3.3.4 Recolección de datos .....	28
3.2.4.1. <i>Recursos</i> .....	28
3.2.1.1. <i>Métodos y técnicas</i> .....	30
3.3.5 Análisis estadístico .....	33
4. Resultados .....	35
4.1 Reconocimiento de hongos con actividad quitinolítica aislados del filoplano de banano .....	35
4.1.1 Aislamiento de hongos quitinolíticos del filoplano de banano.....	35

4.1.2 Selección de otros microorganismos con potencial antagonista ....	38
4.2 Evaluación de la capacidad antagónica del hongo quitinolítico aislado frente a <i>Mycosphaerella fijensis</i> Morelet.....	39
4.2.1 Preparación para el enfrentamiento de cultivo dual .....	39
4.2.2 Enfrentamiento de cultivos dual .....	40
4.3 Comparación de la capacidad antagónica de los microorganismos analizados.....	42
4.3.1 Velocidad de crecimiento .....	44
5. Discusión .....	46
6. Conclusiones.....	48
7. Recomendaciones.....	49
8. Bibliografía.....	50
9. Anexos .....	57
9.1 Protocolos utilizados dentro del laboratorio .....	66
9.1.1 Protocolo para la extracción de quitina del exoesqueleto del camarón .....	66
9.1.2 Protocolo para el aislamiento de <i>M. fijensis</i> por el método de siembra directa .....	66
9.1.3 Protocolo para el aislamiento de hongos quitinolíticos del filoplano de banano .....	67

**Índice de tablas**

Tabla 1. Descripción de los tratamientos .....	28
Tabla 2. Detalle de materiales.....	29
Tabla 3. Test de Tukey tratamiento T1 vs T4 Alfa=0,01 DMS=0,25525 .....	41
Tabla 4. Test de Tukey de todos los tratamientos Alfa=0,01 DMS=0,25119.....	42
Tabla 5. Crecimiento radial en cm.....	63
Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del hongo fitopatógeno en enfrentamiento con el hongo quitinolítico. ....	63
Tabla 7. Datos del crecimiento radial en cm de cada uno de los tratamientos.....	64
Tabla 8. Análisis de la varianza entre T1 vs T4.....	64
Tabla 9. Análisis de la varianza entre todos los tratamientos.....	64
Tabla 10. Análisis de la varianza del PICR.....	65

## Índice de figuras

Figura 1. Extracción de Quitina a partir del exoesqueleto del camarón .....	35
Figura 2. Criterio de selección para muestras en campo .....	36
Figura 3. Halo de crecimiento a través del medio de cultivo semi-selectivo.....	37
Figura 4. Caracterización morfológica del hongo quitinolítico aislado .....	37
Figura 5. Hongo quitinolítico aislado y purificado en medio de cultivo PDA.....	38
Figura 6. Cultivo monospórico de <i>Mycosphaerella fijensis</i> Morelet.....	39
Figura 7. <i>M. fijensis</i> teñida con cristal violeta al 1% observada en el microscopio	40
Figura 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del hongo fitopatógeno	40
Figura 9. Crecimiento del hongo fitopatógeno inhibido por el hongo quitinolítico.	41
Figura 10. Acción de <i>Trichoderma spp.</i> como antagonista del fitopatógeno .....	43
Figura 11. Bacteria quitinolítica sin éxito en la inhibición del fitopatógeno .....	43
Figura 12. Gráfico de cajas de los resultados del PICR. ....	44
Figura 13. Porcentaje de inhibición radial a los 3, 6 y 9 días de desarrollo.....	45
Figura 14. Procesamiento de muestras recolectadas en campo.....	57
Figura 15. Peso para preparación de medios de cultivos.....	57
Figura 16. Procedimiento para el aislamiento del hongo fitopatógeno .....	57
Figura 17. Caracterización morfológica mediante el uso del microscopio .....	58
Figura 18. Esterilización de medios de cultivo.....	58
Figura 19. Colecta de hojas de banano con lesiones de sigatoka negra .....	58
Figura 20: Almacenamiento de quitina extraída .....	59
Figura 21. Preparación de solución con Tween 20 al 0,2% .....	59
Figura 22. Quitina coloidal extraída debidamente almacenada.....	59
Figura 23. Preparación de dosis de quitina coloidal para adicionar al medio .....	60
Figura 24. Corte de muestras de campo para obtener la solución madre .....	60

Figura 25. Agitación de las muestras con la ayuda de un vortex .....	60
Figura 26. Diluciones seriadas realizadas .....	61
Figura 27. Diseño experimental ejecutado en las placas petri .....	61
Figura 28. Mediciones con calibrador del crecimiento radial de los hongos.....	61
Figura 29. Registro de los datos.....	62
Figura 30. Observaciones finales con el tutor de tesis .....	62
Figura 31. Gráfico del test de Tukey Alfa=0.01 .....	65

## Resumen

Existen hongos que tienen capacidades de degradar la quitina, carbohidrato que está presente en las paredes celulares de los hongos como es el caso de *Mycosphaerella fijensis* Morelet causante de la enfermedad conocida como sigatoka negra, es por ello, que encontrar hongos con esta capacidad los convierte en potenciales agentes para control biológico de enfermedades en cultivos de importancia económica. Se planteó la presente investigación con el objetivo de encontrar en el filoplano del banano un hongo que posea capacidad quitinolítica para poder inhibir el desarrollo normal del hongo fitopatógeno dentro del laboratorio en condiciones *in vitro*. Se aplicó un diseño estadístico completamente al azar DCA con 4 tratamientos y un total de 10 repeticiones. La medida de comparación se la realizó por medio de un test de Tukey con una significancia de  $P < 0,01$  donde se obtuvieron resultados significativos. El hongo quitinolítico aislado fue caracterizado morfológicamente como *Penicillium* sp. Ilegando a inhibir el desarrollo de *M. fijensis* con una media de 67,19% con diferencia estadística significativo que rechazó la hipótesis nula que argumentaba que ningún tratamiento con el hongo quitinolítico aislado presentó inhibición en el desarrollo de *M. fijensis*. Con fines comparativos se analizó el antagonismo de *Trichoderma* spp. T3 y una bacteria quitinolítica aislada T2. En donde el mayor porcentaje de inhibición lo presento T3 con una media de 88,76% de inhibición y T2 el cual no presentó diferencia significativa con una media de 8,17%.

Palabras clave: Actividad quitinolítica, antagonismo, enfrenamientos de cultivo dual, *Penicillium* sp.

### Abstract

There are fungi that have the ability to degrade chitin, a carbohydrate that is present in the cell walls of fungi, such as *Mycosphaerella fijensis* Morelet, which causes the disease known as black sigatoka, finding a fungus with this capacity makes them in potential agents for biological control of important diseases in economically important crops. The present research was proposed with the objective of finding a fungus in the banana phylloplane that has chitinolytic capacity to be able to inhibit the normal increase of the phytopathogenic fungus within the laboratory under *in vitro* conditions. A completely randomized design (CRD) was applied with 4 treatment and 10 repetitions. The comparison measure was carried out through Tukey test with a significance of  $P < 0.01$  where significant results were obtained. The isolated chitinolytic fungus was morphologically characterized as *Penicillium* sp. even inhibiting the development of *M. fijensis* with an average of 67.19% with a statistically significant difference that rejected the null hypothesis that argued that no treatment with the isolated chitinolytic fungus presented inhibition in the increase of *M. fijensis*. For comparative purposes, the antagonism of *Trichoderma* spp. T3 and an isolated chitinolytic bacterium T2 were analyzed where the highest percentage of inhibition was presented by T3 with a mean of 88.76% of inhibition and T2 which did not present a significant difference with a mean of 8.17%.

Keywords: Chitinolytic activity, antagonism, dual crop showdowns, *Penicillium* sp.

## 1. Introducción

### 1.1 Antecedentes del problema

Como lo establece Mena (2014), la sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijensis* afecta una gran parte de la producción bananera y platanera en Colombia. Según el autor se debe promover las investigaciones tanto dentro del laboratorio como en el campo, para el control y erradicación del hongo *M. fijensis* en los cultivos mencionados.

Las manchas foliares por sigatoka en banano representan una amenaza para la producción sostenible del cultivo de bananas a nivel mundial. La enfermedad se ha adaptado a diversas condiciones climáticas y con el tiempo ha aumentado su agresividad (Guzmán, 2013; García, Marcillo, y Palacios, 2019).

Para combatir las principales enfermedades de banano como sigatoka Negra se requiere un manejo intensivo y conocimientos técnicos para lograr una investigación más sólida y promover el uso de insumos orgánicos. El cambio climático mundial influirá en la incidencia y gravedad de las enfermedades en banano y será más difícil controlarlas con la dependencia de fungicidas convencionales (Elbehri, *et al.*, 2015; Valverde, García, Moreno, y Socorro, 2019).

La producción de banano bajo el sistema de comercio justo como lo indica Borja (2016), debe estar asociado con la disminución en la aplicación de agroquímicos y el uso de tecnologías que causen un menor impacto al medio ambiente para lograr la sostenibilidad.

Es necesario que se busquen alternativas biológicas que tengan un potencial efecto sobre fitopatógenos, sin afectar el ecosistema de los microorganismos benéficos para los cultivos y lograr así minimizar el impacto sobre el ambiente y la salud humana (Barrera, Combatt, y Ramírez, 2011; Campuzano, Urquijo, y Valderrama, 2017).

## **1.2 Planteamiento y formulación del problema**

### **1.2.1 Planteamiento del problema**

La sigatoka negra es una de las enfermedades más nocivas que afectan al cultivo de banano en la actualidad. Su control se vuelve más complejo y costoso debido al uso de grandes cantidades de fungicidas en varias aplicaciones anuales, cuyas dosis van aumentando progresivamente. Los estudios de uso de microorganismos para el control de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet no han tenido el éxito esperado para competir con los tratamientos convencionales, debido a que los microorganismos utilizados no se adaptan al microclima de la superficie de la hoja de banano (filoplano) por los cambios bruscos de temperatura y humedad (Muñoz y Vargas, 2006; Orozco *et al.*, 2008).

### **1.2.2 Formulación del problema**

¿Pueden encontrarse hongos en el filoplano de banano que presenten actividad quitinolítica que puedan inhibir el desarrollo normal de *Mychospaherella fijiensis* Morelet in vitro?

## **1.3 Justificación de la investigación**

El presente trabajo de investigación pretende aportar información para la búsqueda de alternativas para el control biológico de sigatoka negra, que ha colocado en riesgo la producción de banano mundial, convirtiéndose en una problemática no solo en la producción de las plantaciones bananeras, sino también atacando ecosistema mediante el uso excesivo de fungicidas que atentan la salud humana y el medio ambiente. Buscar una solución frente a este problema debería convertirse en prioridad para la producción agrícola de este cultivo, el cual constituye la mayor fuente económica en el sector agrícola del Ecuador.

Lograr un resultado positivo en esta investigación abre las puertas al uso de microorganismos que puedan complementar los programas de control actuales de la enfermedad, que han fracasado por el aumento de la agresividad del patógeno.

#### **1.4 Delimitación de la investigación**

El presente análisis se desarrolló en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Agraria del Ecuador, tendrá una duración aproximada de seis meses y está enfocado a los productores de bananeros e investigadores que busquen desarrollar nuevos programas de controles fitosanitarios en el cultivo de banano.

#### **1.5 Objetivo general**

Analizar la capacidad antagónica en hongos quitinolíticos aislados del filoplano de la hoja de banano en comparación a microorganismos utilizados actualmente para el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijensis* Morelet).

#### **1.6 Objetivos específicos**

- Reconocer hongos con actividad quitinolítica (potencial antagónico) aislados del filoplano de la hoja de banano.
- Evaluar la capacidad antagónica del hongo quitinolítico aislado frente a (*Mychosphaerella fijensis* Morelet).
- Comparar la capacidad antagónica de los microorganismos analizados.

#### **1.7 Hipótesis**

Al menos uno de los tratamientos con el uso del hongo quitinolítico aislado presentará inhibición en el desarrollo de *Mycosphaerella fijensis* Morelet.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Estado del arte

Se ha logrado comprobar que el uso de microorganismos benéficos para el control biológico de enfermedades, ayudan al desarrollo de los cultivos y actúan en contra de patógenos y plagas que afectan los agroecosistemas. Algunos estudios han realizado evaluaciones de las capacidades antagónicas y quitinolíticas de bacterias que se determinó por la capacidad del microorganismo benéfico de inhibir el desarrollo del fitopatógeno en condiciones *in vitro* dentro del laboratorio (Cabra, Rodríguez, y Villota, 2014).

Además se destaca la evidencia en el uso de productos que provengan de la quitina como posibles controladores biológicos de enfermedades como la sigatoka negra, como lo explican Ayala, Colina, Rosales y Cárdenas, (2014) quienes establecen que el uso del quitosano se convierte en una alternativa válida debido a que es un producto de origen orgánico biodegradable y no tóxico que podría cubrir las necesidades mundiales de la agricultura sustentable.

Como podemos analizar en la investigación realizada por Samuelian (2016) quien expresa que no se le ha dado la importancia suficiente al desarrollo de controles biológicos integrados como alternativa al uso de productos químicos, dado que las grandes empresas prefieren invertir grandes cantidades de dinero en la formulación de productos sintéticos que rápidamente controlen las plagas de sus cultivos, sin tomar en cuenta las consecuencias de mediano y largo plazo. Existen muchas ventajas al usar estas alternativas e incentivar la investigación en temas como; reducción de la incidencia de la enfermedad, disminución a las aplicaciones de fungicidas, menores riesgos de resistencia de los patógenos a los fungicidas. En este estudio se centraron en el uso de *Trichoderma* spp. para controlar el

crecimiento de patógenos fúngicos en la hoja de banano en combinación con productos químicos. En la búsqueda de una alternativa a los plaguicidas tradicionales que son utilizados para el control de la sigatoka negra se han encontrado microorganismos con potencial inhibitorio para este patógeno, existiendo cepas bacterianas aisladas de la filosfera de *Musa* spp. cuya actividad antifúngica ha sido cuantificada mediante cultivos duales. Se ha determinado que existe diversidad bacteriana para el control de la enfermedad (Cruz, *et al.*, 2016).

También se puede evidenciar el uso de hongos filamentosos con actividad quitinolítica como alternativas para realizar control biológico de fitopatógenos, como en la evaluación realizada por Campuzano, Urquijo, y Valderrama (2017) quienes aislaron de la rizósfera de la papa hongos con actividad celulítica y quitinolítica para el control biológico de *Rhizoctonia Solani*. De la totalidad de los hongos caracterizados solamente *Rizopus* spp. presentó la mejor actividad antagónica frente al patógeno, y es posible considerar el uso de este microorganismo para un control de la enfermedad.

Analizando la metodología propuesta por Carr, Villalta, Rodríguez y Guzmán, (2017) que consiste en la recolección de hojas de banano depositadas en el suelo con lesiones de la enfermedad, que presenten un crecimiento micelar de hongos diferentes a el causante de la enfermedad, las muestras se procesan en el menor tiempo posible, se cultivan en un medio líquido rico en quitina coloidal y se utilizan los metabolitos secundario para interferir en el desarrollo normal del fitopatógeno.

La metodología anteriormente descrita “puede servir como base para estudios de prospección de hongos con potencial para el combate bilógico de la sigatoka Negra. La implementación de la misma, ha posibilitado aislar de plantaciones de banano hongos antagonistas de *M. fijensis*” (Carr, *et al.*, 2017, p.64).

## 2.2 Bases teóricas

### 2.2.1 Generalidades del cultivo de banano

#### 2.2.1.1. Taxonomía y Origen

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Zingiberales
Familia:	Musaceae
Género:	<i>Musa</i>
Especie:	<i>M. acuminata</i>

El banano es una planta monocotiledónea, perteneciente a la familia de las musáceas que pertenecen al orden de las Zingiberales o Escitamiáceas (Sotover y Simmonds, 1987).

El origen del banano tiene lugar en el sudeste asiático en las regiones de India, Indonesia, Malasia y Nueva Guinea.

El fruto de banano es un alimento que posee propiedades nutricionales bastante enriquecidas para la nutrición humana. Con alto contenido de vitamina A, vitamina C, carbohidratos, fibra y agua. Además es fuente de energía y potasio (Gonzabay, 2013).

El banano se cultiva en la mayoría de regiones tropicales convirtiéndose en un cultivo de importancia para la economía de muchos países en desarrollo, considerando al banano en valores brutos de producción ocupa el cuarto lugar en el cultivo alimentario más importante del mundo. El banano es un producto primordial para las exportaciones de muchos países del Trópico (Salazar y Del Cioppo, 2015).

### **2.2.2 La importancia del banano en el Ecuador**

El cultivo de banano en el Ecuador es importante en el ámbito comercial y social, representa el 2% del PIB general y aproximadamente el 35% del PIB agrícola. Este cultivo genera empleo a 1 millón de familias y beneficia a 2,5 millones de personas aproximadamente, que representa el 6% de la población total del país (Ministerio de Comercio Exterior, 2017).

El banano es el producto agrícola que genera la mayor cantidad de plazas de empleos en el sector agrícola. Durante este mismo año el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, (INEC, 2017) en la encuesta de superficie y producción agropecuaria continua expone que la superficie nacional bananera presentó un decremento de 9,98%. La superficie cosechada también presentó un decrecimiento del 12,35% en comparación a los datos del año 2016.

La industria bananera es la principal en el sector agrícola ecuatoriano y la preocupación clave para la producción bananera son las probables consecuencias del aumento de incidencia de plagas y enfermedades provocadas por el clima, afectando en los rendimientos futuros del banano y su vialidad a largo plazo como lo expone Elbehri, *et al* (2015) mediante su estudio sobre el cambio climático y sostenibilidad del banano en el Ecuador. Además, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 1999) determina que las enfermedades son el principal factor limitante de los cultivos y que los países productores invierten considerables sumas de dinero en los estudios de investigación, transferencia y control de las mismas. En Ecuador como en la mayoría de países de Latinoamérica y el Caribe las enfermedades constituyen también el mayor obstáculo para la producción.

En una investigación documentada realizada por Capa, Alaña y Benítez (2016) en donde se detalla la importancia que tiene el cultivo de banano orgánico para la provincia de El Oro, y se plasman las problemáticas que producen los costos elevados de los insumos químicos y la baja calidad en los productos de origen orgánico.

### **2.2.3 La sigatoka negra**

El primer reporte de la enfermedad de manchas foliares por sigatoka, específicamente de sigatoka amarilla, se presentó en Java por Zimmerman en 1902 y consecutivamente en el valle de Sigatoka en la isla de Viti Levu, Fiji de donde nace el característico nombre aun usado por los agricultores (Mourichon y Fullerton, 1992).

La sigatoka amarilla cuyo agente causal es *Mycosphaerella musicola* Leach (anamorfo *Pseudocercospora musae* [Zimm.] Deighton), fue la enfermedad foliar con mayor incidencia en el banano donde se reportó numerosas pérdidas en 1912 (Jones, 2000). Se expandió rápidamente en los años de 1930 y llevo a pensar que las esporas de los hongos eran esparcidas por las corrientes de aire, teoría que fue desestimada por Jones (2000) al aclarar que la eficiente dispersión por largas distancias solo puede producirse por el movimiento de material vegetal sin control sanitario.

La enfermedad de la raya negra conocida hoy mundialmente como sigatoka negra cuyo agente causal es *Mycosphaerella fijensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijensis* [Morelet] Deighton), analizada inicialmente en la isla de Fiji en 1963, posteriormente fue observada a unos 60 Km del valle de Sigatoka donde también fue reportada la sigatoka amarilla, aunque esta enfermedad debería

llamarse raya negra, su nombre sigatoka negra ha sido ampliamente aceptado en todas las zonas productoras de banano (Marín *et al.*, 2003; Céspedes, 2008).

Estas fitopatologías presentan una sintomatología similar que consisten en manchas marrones al inicio, que se tornan agresivas hasta formar lesiones necróticas y halos amarillentos con el centro ligeramente gris. Los daños causados por la sigatoka negra son más visibles que los causados por sigatoka amarilla substancialmente en el envés de la hoja y los daños principalmente en hojas jóvenes, por lo que produce un daño más agresivo en el tejido foliar de la planta y se considera más peligrosa que la sigatoka amarilla (Polanco, Carlier, y Zapater, 2002).

Las lesiones pueden destruir áreas importantes de tejido foliar, lo cual reduce la capacidad natural de realizar fotosíntesis en la planta, además de inducir a la madurez prematura de los frutos que impactará directamente con el rendimiento y producción de la plantación (Fullerton y Olsen, 1995; Guzmán, 2002; Manzo *et al.*, 2005).

#### **2.2.4 Combate biológico utilizando microorganismos quitinolíticos**

Las enfermedades causadas por sigatoka colocan en riesgo algunos aspectos de la producción sostenible de banano. “La agricultura sostenible debe garantizar la seguridad alimentaria mundial y al mismo tiempo promover ecosistemas saludables y apoyar la gestión sostenible de la tierra, el agua y los recursos naturales” (FAO, 2015, párr. 2). Los problemas que genera la enfermedad aumentan el uso de agroquímicos que afectan la salud del medio ambiente que interfiere en la posibilidad de que un sistema de producción sea sostenible (FAO, 2015).

La tendencia de los mercados norteamericanos y europeos se esta enfocando en obtener productos sostenibles, cabe mencionar que Holanda en el año 2015 exigía que el 20% de sus productos agrícolas provengan de plantaciones sostenibles y han establecido que a partir del 2020 el 100% de los productos deberán ser sostenibles (Arteaga, 2017).

La aparición de esta enfermedad causó en la mayoría de países un tremendo impacto tanto social como económico, afectó también fuertemente a la productividad de plantaciones bananeras de los pequeños y medianos agricultores (Stover, 1980) sería imposible llegar a un sistema de producción sostenible de banano en el Ecuador si no se adoptan medidas alternativas para el control de las manchas foliares por sigatoka. (García, Marcillo, y Palacios, 2019)

Existen alternativas que podrían dar resultados en la producción sostenible de banano por mencionar una de ellas podría ser el control cultural como lo expresan Orozco, *et al*, (2008) que reduce las fuentes de inóculos del patógeno y las condiciones favorables para que se desarrolle la enfermedad, es necesario conocer el comportamiento de la enfermedad y de las amenazas que con ella acarrea su mal manejo.

El uso de microorganismos con capacidades quitinolíticas podrían influir positivamente al desarrollo de nuevos productos de origen orgánico que permitan plantearle una solución o alternativa que permitan mejorar el de las manchas foliares por sigatoka negra incrementando así la productividad y reduciendo costos en el manejo fitosanitario, como lo sostienen Gutierrez, Villegas, Mira y Argel (2011) el uso de formulaciones con microorganismos antagonistas pueden aportar a el control con el uso de productos cuyos componentes principales son compuestos orgánicos.

## 2.3 Marco legal

Esta investigación se sustenta en las leyes y políticas que rigen en el Ecuador. Siendo analizadas para cumplir con todas las normas decretadas en las regulaciones que se detallan en el siguiente apartado.

### 2.3.2 Constitución de la República del Ecuador

**Art. 14.-** Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*.

Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados (Asamblea Constituyente del Ecuador, 2008).

**Art. 281.-** La soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiados de forma permanente.

El artículo 281 presenta 14 numerales que debe cumplir el estado de los cuales se mencionan los relacionados en la presente investigación:

3. Fortalecer la diversificación y la introducción de tecnologías ecológicas y orgánicas en la producción agropecuaria.

8. Asegurar el desarrollo de la investigación científica y la innovación tecnológica apropiadas para garantizar la soberanía alimentaria.

9. Regular bajo normas de bioseguridad el uso y desarrollo de biotecnología, así como su experimentación, uso y comercialización (Asamblea Constituyente del Ecuador, 2008).

### 2.3.3 Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria

**Art. 7.- Protección de la agrobiodiversidad.** - El Estado así como las personas y las colectividades protegerán, conservarán los ecosistemas y promoverán la recuperación, uso, conservación y desarrollo de la agrobiodiversidad y de los saberes ancestrales vinculados a ella. Las leyes que regulen el desarrollo agropecuario y la agrobiodiversidad crearán las medidas legales e institucionales necesarias para asegurar la agrobiodiversidad, mediante la asociatividad de cultivos, la investigación y sostenimiento de especies, la creación de bancos de semillas y plantas y otras medidas similares así como el apoyo mediante incentivos financieros a quienes promuevan y protejan la agrobiodiversidad (Ley Orgánica del Regimen de la Soberanía Alimentaria, 2009).

**Art. 9.- Investigación y extensión para la soberanía alimentaria.** - El Estado asegurará y desarrollará la investigación científica y tecnológica en materia agroalimentaria, que tendrá por objeto mejorar la calidad nutricional de los alimentos, la productividad, la sanidad alimentaria, así como proteger y enriquecer la agrobiodiversidad.

Además, asegurará la investigación aplicada y participativa y la creación de un sistema de extensión, que transferirá la tecnología generada en la investigación, a fin de proporcionar una asistencia técnica, sustentada en un diálogo e intercambio de saberes con los pequeños y medianos productores, valorando el conocimiento de mujeres y hombres.

El Estado velará por el respeto al derecho de las comunidades, pueblos y nacionalidades de conservar y promover sus prácticas de manejo de biodiversidad y su entorno natural, garantizando las condiciones necesarias para que puedan mantener, proteger y desarrollar sus conocimientos colectivos, ciencias, tecnologías, saberes ancestrales y recursos genéticos que contienen la diversidad biológica y la agrobiodiversidad.

Se prohíbe cualquier forma de apropiación del conocimiento colectivo y saberes ancestrales asociados a la biodiversidad nacional (Ley Orgánica del Regimen de la Soberanía Alimentaria, 2009).

**Artículo 24.- Finalidad de la sanidad.** - La sanidad e inocuidad alimentarias tienen por objeto promover una adecuada nutrición y protección de la salud de las personas; y prevenir, eliminar o reducir la incidencia de enfermedades que se puedan causar o agravar por el consumo de alimentos contaminados (Ley Orgánica del Regimen de la Soberanía Alimentaria, 2009).

#### **2.3.4 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 zoonosológicos 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 zoonosológicas (Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria, 2017).

**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 (Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria, 2017).

### 3. Materiales y métodos

#### 3.2 Enfoque de la investigación

##### 3.2.2 Tipo de investigación

Esta investigación es de característica experimental, de laboratorio con un nivel de conocimiento exploratoria, descriptiva y explicativa.

##### 3.2.3 Diseño de investigación

La presente investigación busca determinar si es posible aislar de la superficie de la hoja de banano hongos que presenten actividad quitinolítica para poder realizar pruebas de antagonismo mediante enfrentamientos de cultivos dual frente a *Mycosphaerella fijensis* Morelet y poder determinar cuantitativamente el porcentaje de inhibición en el crecimiento radial (PICR) ante el patógeno causante de la enfermedad foliar de mayor impacto en el sector bananero conocida como sigatoka negra.

#### 3.3 Metodología

##### 3.3.1 Variables

###### 3.3.1.1. *Variable independiente*

Capacidad antagónica de los microorganismos aislados tanto del filoplano de banano como los disponibles en el laboratorio; hongos y bacteria, frente al microorganismo fitopatógeno.

###### 3.3.1.2. *Variable dependiente*

Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Mycosphaerella fijensis* Morelet causado por los microorganismos analizados.

El tiempo que transcurre para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno de cada uno de los microorganismos analizados para determinar su nivel de agresividad.

### 3.3.2 Tratamientos

**Tabla 1. Descripción de los tratamientos**

Tratamientos	Descripción
T1	<i>Mycosphaerella fijensis</i> + Hongo quitinolítico aislado
T2	<i>Mycosphaerella fijensis</i> + Bacteria quitinolítica aislada
T3	<i>Mycosphaerella fijensis</i> + <i>Trichoderma</i> spp.
T4	<i>Mycosphaerella fijensis</i> sin competencia (CONTROL)

Palacios, 2020

### 3.3.3 Diseño experimental

Se planteó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y diez repeticiones con un total de 40 unidades experimentales, el cual se convierte en el diseño más apropiado para este tipo de investigación en condiciones controladas. (Cochran y Cox, 1974)

El Modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

$\mu$  = Efecto común a todas las observaciones

$T_i$  = Efecto de los tratamientos

$E_{ij}$  = Término de error experimental

### 3.3.4 Recolección de datos

#### 3.2.4.1. Recursos

Se realizó las pruebas en las instalaciones de la Universidad Agraria del Ecuador y se utilizaron materiales y reactivos de laboratorio necesarios para la ejecución de la presente investigación, materiales que son indicados a continuación según la tabla 2.

**Tabla 2. Detalle de materiales**

<b>Materiales</b>	<b>Insumos y Reactivos</b>
Agitadores	Ácido Clorhídrico 2N
Autoclave	Agar
Asa bacteriana	Agua destilada
Balanza Analítica	Agua esterilizada
Cámara de flujo laminar	Alcohol al 96%
Calibrador	Estreptomicina
Cinta de Papel	Hidróxido de sodio (NaOH) al 5%
Cintas adhesivas	Hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%
Estufa	Medio PDA
Fundas plásticas	Tween 20 ®
Guantes	
Lámpara de alcohol	
Marcadores permanentes	
Mascarilla	
Micro-incinerador	
Papel aluminio	
Papel filtro	
Pinzas	
Placas Petri	
Saca bocados	
Tubos de ensayo	
Vasos de precipitación	
Vortex	

### **3.2.1.1. Métodos y técnicas**

#### *3.2.4.2.1. Metodología para el aislamiento de *Mycosphaerella fijensis*.*

Para realizar el aislamiento de *Mycosphaerella fijensis* se utilizó la metodología propuesta por Cuéllar, Álvarez y Castaño (2011) en donde se recolectaron hojas enfermas con sintomatología avanzada de la enfermedad, se incubaron las hojas en cámaras húmedas a 26°C por 48 horas en oscuridad. Posteriormente se cortaron fragmentos, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y etanol al 70% por un minuto respectivamente. Los fragmentos se transfirieron a cajas petri con medio de cultivo PDA y se incubaron a 26°C, una vez esporulado el hongo se tomaron conidias individuales y se sembraron en un nuevo medio, se caracterizaron las colonias morfológicamente a través de un microscopio compuesto para así obtener cultivos monospóricos de *Mycosphaerella fijensis*.

#### *3.2.4.2.2. Metodología para la extracción de la quitina coloidal (QC)*

Para proceder a realizar los medios de cultivos semi-selectivos es necesario disponer de quitina coloidal, para lo cual, se extrajo la quitina del exoesqueleto del camarón mediante la metodología ajustada por Escobar *et al.* (2013) donde se optimiza el protocolo para extraer quitina y quitosano que dentro de este proyecto solo se llegó al proceso de quitina de la siguiente forma:

a) Preparación de la materia prima: Preparar la cascara de camarón lavándola con agua potable por dos ocasiones, secar en un horno a 40°C por 2 horas y triturar y tamizar hasta obtener tamaños de partícula entre 0,8mm y 1.5mm.

b) Desproteínización: Las proteínas existentes se removieron utilizando hidróxido de calcio  $\text{Ca(OH)}_2$  (Químicamente puro) en una solución al 2N en relación 1:10 sólido/líquido a 40°C en agitación constante durante 2 horas, otra alternativa sería (uso de hidróxido de sodio NaOH (Grado analítico) en una concentración al

3,5%) luego se procede a filtrar y a secar el residuo en una estufa a 40°C hasta que esté completamente seco.

c) Desmineralización: La remoción del carbonato de calcio y otras sales presentes en la cascara del camarón fueron eliminados mediante la inmersión de la muestra en relación 1:5 sólido/líquido en una solución de HCL al 2 N en agitación constante durante 1 hora

d) Purificación: Se realiza mediante solución de NaOH al 2% por 1 hora finalmente se estabiliza el pH con agua destilada, se filtra y se seca en estufa a 40°C hasta que esté completamente seca y de buen aspecto.

e) Quitina coloidal: Una vez obtenida la quitina se añaden 10 gr a una solución de HCL al 2% durante 1 hora y se añaden 400 ml de agua destilada y se deja en remoción constante por 24 horas, luego de filtrar el sobrenadante gelatinoso se coloca en un tubo de ensayo estéril y se almacena en refrigeración para su posterior uso.

#### *3.2.4.2.3. Metodología para el aislamiento del hongo con actividad quitinolítica*

Para lograr un correcto procedimiento se utilizará la metodología planteada por Carr, Villalta, Rodríguez, y Guzmán (2017) quienes establecieron la posibilidad de aislar y seleccionar hongos con actividad quitinolítica de las hojas de banano.

En el proceso de recolección de las hojas en campo se debe buscar muestras en donde conviva el hongo fitopatógeno con el hongo antagonista, en consecuencia, de esto, tendremos mayor probabilidad de poder aislar el hongo quitinolítico que se está buscando con una adaptabilidad al medio donde se puede utilizar como agente controlador biológico. Se plantea recolectar muestras de 1 kg aproximadamente las cuales se deben trasladar en fundas plásticas y refrigeradas en un contenedor con capacidad de aislante térmico.

1. Preparación de medios semi-selectivo para el aislamiento:
  - a) Pesar 12 gr de agar y 2,4 g de PDA (6,5 % de la dosis usual) depositarlos en un vaso de precipitado de un litro o más de capacidad.
  - b) Dentro de una cámara de flujo laminar (ambiente estéril), dejar reposar el medio hasta que su temperatura alcance 50-55 °C, momento en el cual se debe adicionar la quitina coloidal (10 ml L<sup>-1</sup>), debido a que las altas temperaturas podrían degradar la quitina.
  - c) Regular el pH a 5 con NaOH 1 M.
2. Aislamiento de los potenciales hongos antagonistas de las muestras recolectadas.
  - a) Preparar una suspensión madre. Se seleccionan de cada muestra 20 discos de hoja de 10 mm de diámetro. Los discos cortados se disponen en un tubo de ensayo de 20 ml de capacidad que contenga 10 ml de agua desionizada estéril, con Tween 20 ® al 0,2 %. Posteriormente, los tubos por espacio de dos minutos se agitan con la ayuda de un agitador vortex y se detiene el procedimiento por 1 minuto para volver a repetirlo.
  - b) De la solución madre se procede a realizar diluciones seriadas hasta 10<sup>-4</sup> en agua destilada.
  - c) De la última dilución se toma una alícuota de 0,2 ml y se distribuye sobre el medio con la ayuda de un asa plana.
  - d) Las cajas petri se deben incubar en la oscuridad a 29 °C durante 7 días y se recomienda realizar observaciones cada 24 horas para identificar que hongos se están desarrollando.

#### 3.2.4.2.4. Metodología para las pruebas de antagonismo *in vitro*

Se utilizaron los hongos aislados en la metodología anterior para poder evaluar su efecto de inhibición, los aislados serán cultivados en medios de cultivos para observar su desarrollo. Para realizar la siembra en cada una de las cajas Petri con PDA, a 1cm de los bordes y se colocará un disco de 9 mm de diámetro de hongo fitopatógeno activo y al lado contrario un disco de 9 mm del hongo con potencial antagonista, se realizó un ajuste de 4,5 mm al momento de tomar el crecimiento radial de los hongos.

Para evaluar el ensayo se lo realizó mediante observaciones después de cada 42 horas donde se obtuvo los radios de crecimientos de patógeno en cultivo dual, con sus respectivos testigos. Se midió con un instrumento de precisión “calibrador” y finalmente se procedió a realizar el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR%) con la siguiente fórmula:

$$PICR = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

Donde:

$R_1$  = Crecimiento radial del patógeno

$R_2$  = Crecimiento radial de patógeno en el cultivo dual con tratamiento

(Espinosa , Torres, y Granda, 2015).

#### 3.3.5 Análisis estadístico

Se planteó la siguiente prueba de hipótesis:

H0: Ninguno de los tratamientos con el uso de hongos quitinolíticos aislados presentó inhibición en el desarrollo de *Mycosphaerella fijensis* Morelet.

H1: Al menos uno de los tratamientos con el uso de hongos quitinolíticos aislados presentó inhibición en el desarrollo de *Mycosphaerella fijensis* Morelet.

Para lograr determinar diferencias en el efecto del microorganismo aislado se utilizó un error experimental del 5%. Para poder detectar las diferencias entre los tratamientos se aplicó un test Tukey ( $P \leq 0,01$ ) en los que se determinó cuáles de los tratamientos presentó mayor grado de inhibición. El software a utilizarse es InfoStat desarrollado por Di Rienzo *et al* (2020) en su versión estudiantil más actualizada.

## 4. Resultados

### 4.1 Reconocimiento de hongos con actividad quitinolítica aislados del filoplano de banano

Se preparó el medio de cultivo selectivo como se indica en la metodología. Para poder lograrlo se extrajo del exoesqueleto del camarón quitina que posteriormente se transformó a quitina coloidal para poderlo adicionar al medio rico en QC. Se obtuvo como resultado quitina en forma de polvo fino de color rosáceo ya que no se utilizó ningún tipo de despigmentante. Como se puede observar en la figura 1 la transformación de la cascara de camarón triturada a Quitina.



Figura 1. Extracción de Quitina a partir del exoesqueleto del camarón Palacios, 2020

Para poder añadirlo al medio semi-selectivo se realizó el proceso para obtener quitina coloidal, se almaceno en un tubo de ensayo estéril se lo mantuvo en refrigeración. Las concentraciones utilizadas en el medio fueron 6,25% de PDA y 10 ml L<sup>-1</sup> de quitina coloidal ya que esta configuración permite que se desarrollen hongos con bajo consumo de nutrientes y que se estimulara la producción de la enzima quitinasa para poder hidrolizar la quitina suspendida en el medio.

#### 4.1.1 Aislamiento de hongos quitinolíticos del filoplano de banano

Las colectas de las muestras en campo fueron tomadas en fincas que no hayan fumigado con fungicidas sintéticos, de preferencia pequeñas plantaciones

bananeras manejadas de forma orgánica o con el mínimo uso de agroquímicos para poder encontrar cepas de hongos vivas. La ubicación de esta finca llamada “Formosa” fue la provincia de Los Ríos en el cantón Mocache sector La Serranita. La zona es ampliamente desarrollada en el cultivo de banano en pequeña, mediana y gran escala. Las muestras fueron tomadas siguiendo estrictamente la metodología de Carr *et al* (2017) logrando los resultados esperados.

El criterio para seleccionar las muestras fue la convivencia entre patógeno y el potencial controlador biológico, se observaron esporulaciones de hongos diferentes de *M. fijensis* sobre lesiones como se demuestra en la figura 2.



Figura 2. Criterio de selección para muestras en campo  
Palacios, 2020

Consecuentemente se logró añadir en 10 cajas petri con el medio de cultivo semi-selectivo la alícuota correspondiente de la solución madre preparada con el material de campo como se planteó en la metodología. Se observó el desarrollo de los hongos cada 24 horas, a las 72 horas se pudo observar claramente que una de las colonias de los hongos que se estaban desarrollando, empezaba a producir un halo diferente de los demás, característica clave al momento de elegir el hongo con capacidades quitinolíticas. Como se puede observar en la figura 3 en donde el

hongo quitinolítico empieza a degradar la quitina y a expandirse a través del medio de cultivo de cultivo.



Figura 3. Halo de crecimiento a través del medio de cultivo semi-selectivo Palacios, 2020

Posteriormente se lo repico y se purifico en una placa con medio de cultivo PDA observándose su crecimiento. Se realizó una caracterización morfológica para determinar el género. Por su morfología como se observa en la figura 4 se puede argumentar que pertenece a la familia de los Trichocomaceae del género *Penicillium*, evidenciando su cultivo monospórico en la figura 5.



Figura 4. Caracterización morfológica del hongo quitinolítico aislado Palacios, 2020

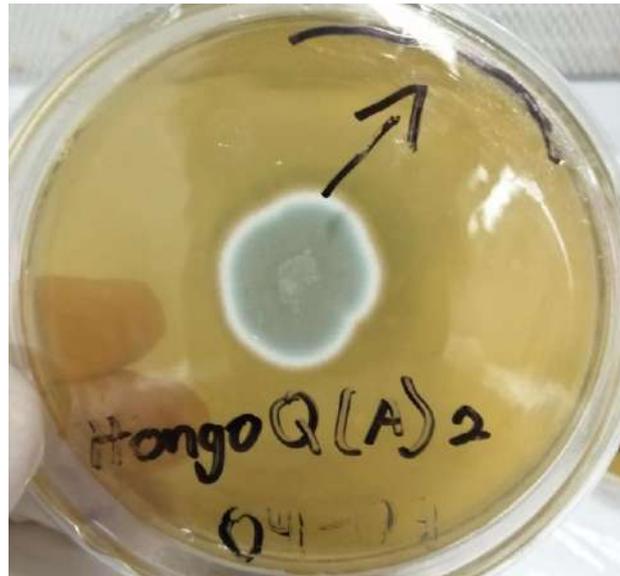


Figura 5. Hongo quitinolítico aislado y purificado en medio de cultivo PDA  
Palacios, 2020

#### 4.1.2 Selección de otros microorganismos con potencial antagonista

En la metodología descrita para el aislamiento de hongos quitinolíticos también se pudo observar que en una de las placas hubo el crecimiento acelerado de una bacteria que rápidamente colonizo toda la placa degradando las partículas de quitina suspendidas en el medio. Por lo cual, se definió como bacteria quitinolítica para su análisis en los enfrentamientos como se describe en la tabla 1. Cabe recalcar que solo se estudió este microorganismo con fines comparativos entre los tratamientos.

En el planteamiento de las variables independientes se estableció el uso de *Trichoderma* spp. por su conocido mecanismo de acción frente a hongos fitopatógenos, para esta investigación se procedió a tomar una cepa activa que se encuentra en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Agraria del Ecuador. Esta es una cepa bastante agresiva que tiene un desarrollo muy eficaz, que en cuestión de horas puede colonizar gran parte del medio de cultivo.

## 4.2 Evaluación de la capacidad antagónica del hongo quitinolítico aislado frente a *Mycosphaerella fijensis* Morelet.

### 4.2.1 Preparación para el enfrentamiento de cultivo dual

Para evaluar la capacidad antagónica del hongo aislado es necesario tener disponible el hongo fitopatógeno debidamente aislado y purificado, este procedimiento se lo realizó siguiendo la metodología propuesta Cuéllar *et al* (2011) obteniéndose como resultado la cepa de *M. fijensis* aislada en cultivos monospóricos como podemos comprobarlo en la figura 6.



Figura 6. Cultivo monospórico de *Mycosphaerella fijensis* Morelet Palacios, 2020

Para tener la certeza de que se trataba de esta especie, se realizó la caracterización morfológica utilizando el método de diagnóstico rápido propuesto por Aguirre, Castaño y Zuluaga (2003) por medio de microscopio compuesto y cristal violeta al 1% como medio tinción para facilitar la identificación de la característica específica que lo diferencia de otras especies como *musicola* o *musae*. El colorante tiñe los conidios, provocando una coloración más intensa en la cicatriz también conocida como hilio. Se puede observar esta característica según la figura 7.



Figura 7. *M. fijensis* teñida con cristal violeta al 1% observada en el microscopio Palacios, 2020

#### 4.2.2 Enfrentamiento de cultivos dual

Para evaluar la capacidad antagónica del hongo quitinolítico aislado se lo realizó mediante enfrentamiento de cultivo dual, donde se tomaron datos correspondientes al crecimiento radial del hongo fitopatógeno dentro de cada uno de los tratamientos.

Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del hongo fitopatógeno se aplicó la fórmula descrita en la metodología, realizando los cálculos respectivos se obtuvieron como resultados los datos mostrados según la figura 8.

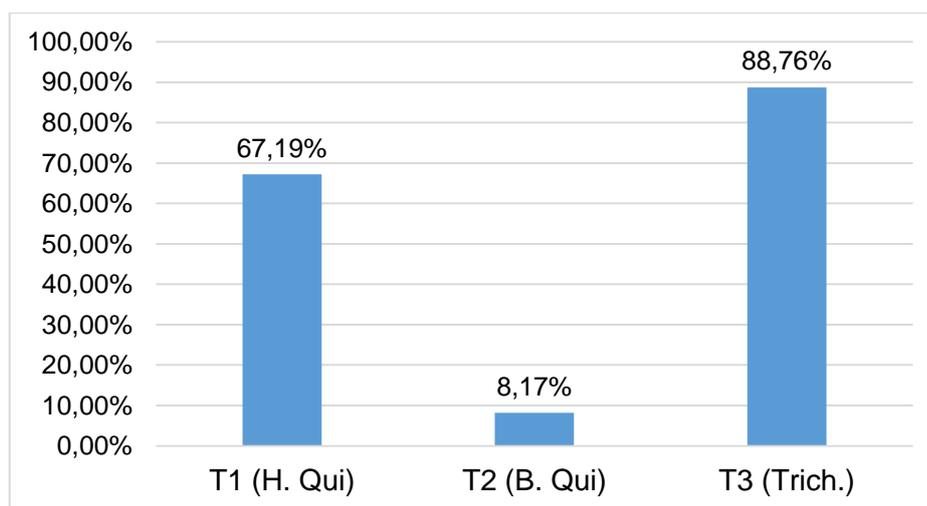


Figura 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del hongo fitopatógeno Palacios, 2020

Para evaluar que exista diferencia estadística entre los tratamientos se procedió a realizar un análisis de varianza y test de Tukey con un alfa de 0,01 como se puede observar según la tabla 3.

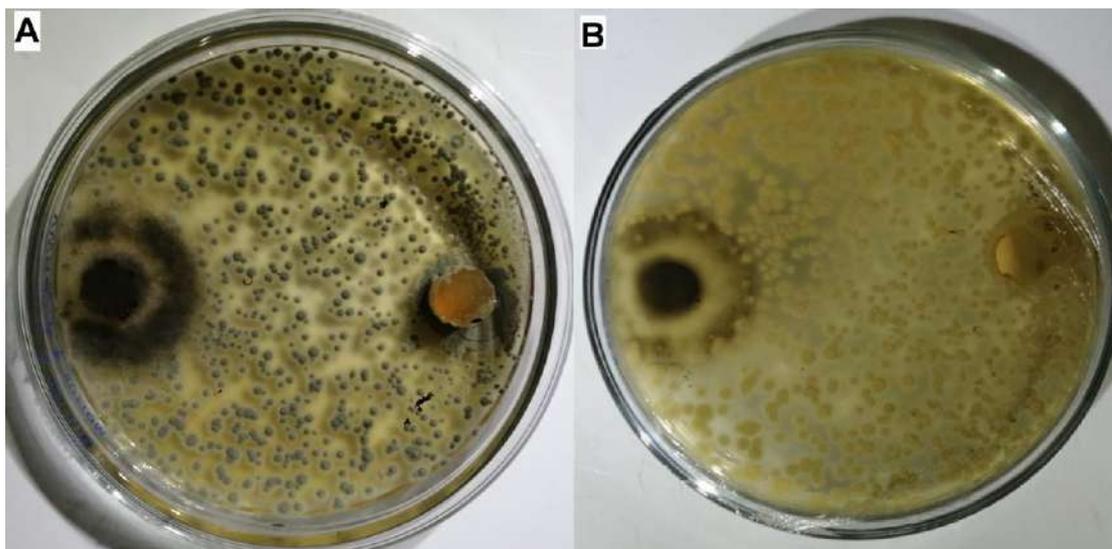
**Tabla 3. Test de Tukey tratamiento T1 vs T4 Alfa=0,01 DMS=0,25525**

Tratamientos	Medias	E.E	
T1	1,21	0,06	A
T4	3,50	0,06	B

Palacios, 2020

Como se puede evidenciar según la tabla 3 la diferencia en las letras confirma que existe diferencia estadística entre los tratamientos, rechazando así la hipótesis nula  $H_0$  de la presente investigación.

La acción quitinolítica pudo inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno hasta en un 76% en una de las repeticiones del diseño experimental planteado, lo cual, queda demostrado por medio de la figura 8 donde se puede observar en el lado izquierdo de la placa el crecimiento radial inhibido por la presencia del hongo aislado del filoplano del banano.



Nota: A) Parte frontal B) Parte posterior

Figura 9. Crecimiento del hongo fitopatógeno inhibido por el hongo quitinolítico  
Palacios, 2020

### 4.3 Comparación de la capacidad antagónica de los microorganismos analizados.

Los microorganismos que fueron analizados en el presente proyecto fueron 3, el primero de ellos fue el descrito en el T1 que corresponde al hongo quitinolítico aislado del filoplano del banano. T2 que corresponde a la bacteria quitinolítica aislada del filoplano de banano y T3 que fue *Trichoderma* spp. Aislado dentro del laboratorio de fitopatología de la Universidad Agraria del Ecuador y T4 que corresponde al crecimiento de *M. fijensis* sin ningún tipo de enfrentamiento. Para fines comparativos se determinó cuál de estos tratamientos produce mayor inhibición en el crecimiento de *M. fijensis* mediante enfrentamientos de cultivos dual.

Los datos fueron recopilados después de 9 días, tiempo que le toma al hongo fitopatógeno colonizar el 100% del medio de cultivo. Con respecto al análisis estadístico, se realizó un análisis de varianza para determinar si existe diferencia estadística entre los tratamientos y se realizó una prueba de comparación utilizando un test de Tukey, como se muestra en la tabla 4.

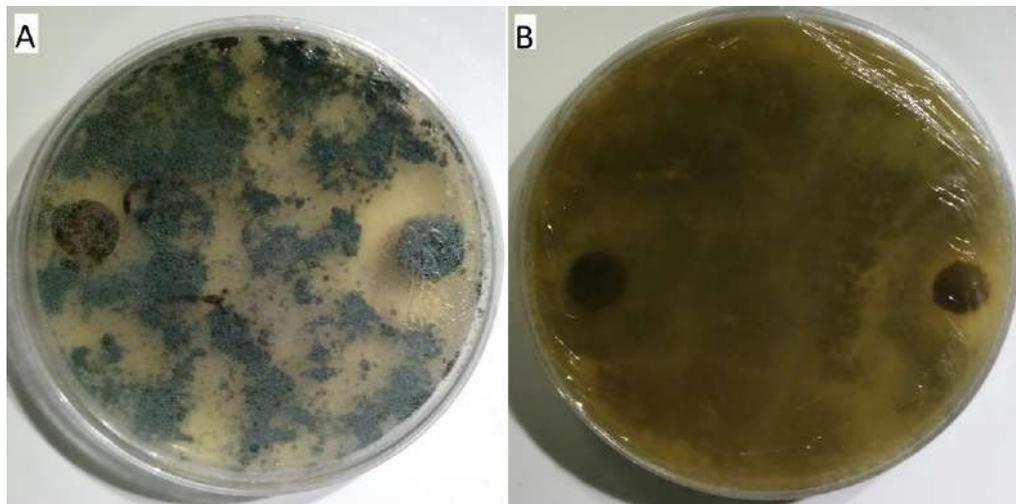
**Tabla 4. Test de Tukey de todos los tratamientos Alfa=0,01 DMS=0,25119**

Tratamientos	Medias	E.E		
T3	0,40	0,05	A	
T1	1,21	0,05		B
T2	3,27			C
T4	3,50			C

Palacios, 2020

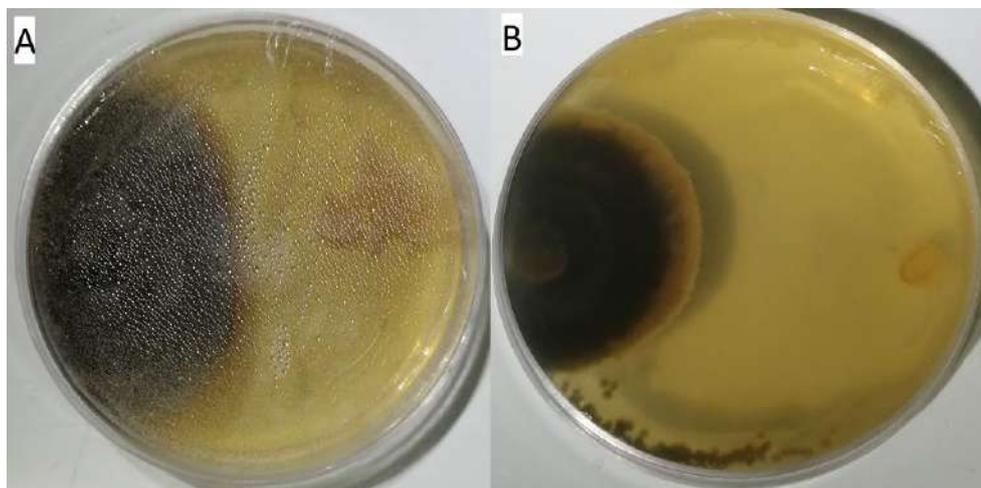
Como se puede observar en la tabla 4 el tratamiento con menor crecimiento radial fue el de T3, que corresponde a *Trichoderma* spp, debido a su agresividad es un hongo ampliamente estudiado por su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como se puede observar según la figura 10, seguido del T1

que corresponde al tratamiento con el uso del hongo quitinolítico según figura 9. Finalmente, en el T2 no se observó diferencia estadística significativa del tratamiento testigo T4 como se observa en la figura 11.



Nota: A) Parte frontal B) Parte posterior

Figura 10. Acción de *Trichoderma spp.* como antagonista del fitopatógeno Palacios, 2020



Nota: A) Parte frontal B) Parte posterior

Figura 11. Bacteria quitinolítica sin éxito en la inhibición del fitopatógeno Palacios, 2020

Para evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se hicieron los cálculos utilizando la fórmula de PCIR para obtener resultados presentados en la figura 12.

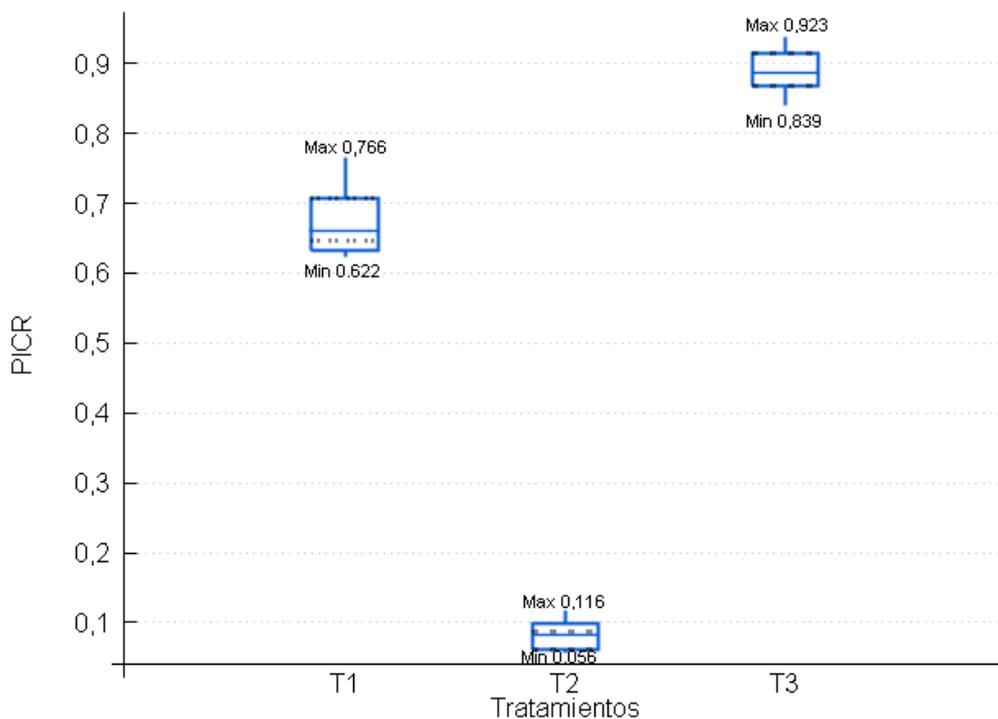


Figura 12. Gráfico de cajas de los resultados del PICR.  
Palacios, 2020

Esta figura nos permite observar los máximos y mínimos alcanzado por cada uno de los tratamientos analizados, así como podemos de manera gráfica apreciar las medias de los tratamientos y en qué lugar del plano se encuentran ubicados. De esta manera los tratamientos siendo diferentes estadísticamente se ubican en diferentes posiciones. Cabe recalcar que el máximo alcanzado por el tratamiento con el uso del hongo quitinolítico *Penicillium* sp. fue de un 76,6%.

#### 4.3.1 Velocidad de crecimiento

En cuanto a la velocidad de inhibición en el crecimiento radial. El que inhibió el crecimiento del hongo fitopatógeno con mayor rapidez fue el T3, ya que el crecimiento de *Trichoderma* spp es agresivo y logró al tercer día inhibir el 47,04% del crecimiento del hongo fitopatógeno. Seguido del T1 que pudo inhibir el 45,94% pero al sexto día el crecimiento del hongo fitopatógeno. Se puede observar la velocidad de inhibición en la figura 13.

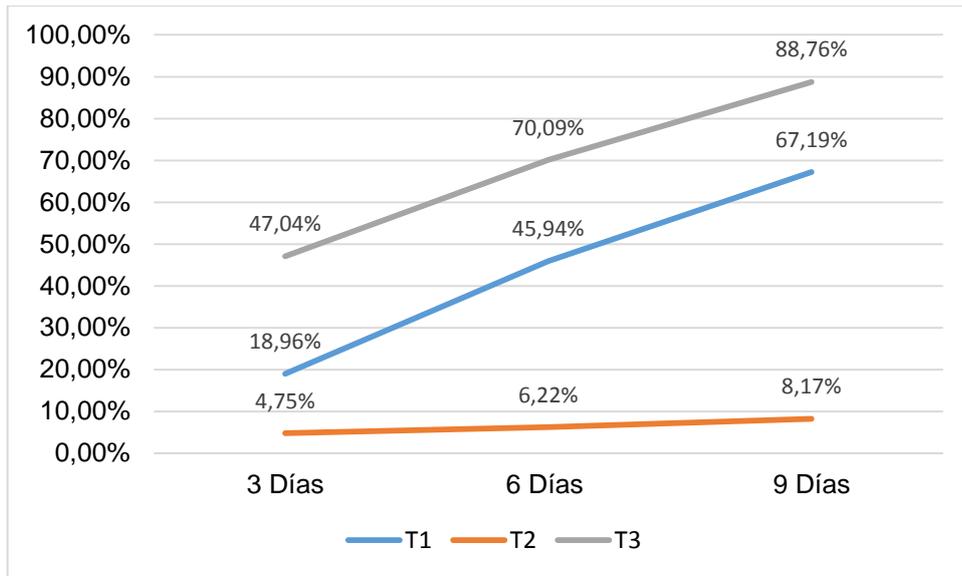


Figura 13. Porcentaje de inhibición radial a los 3, 6 y 9 días de desarrollo. Palacios, 2020

## 5. Discusión

En el planteamiento de esta investigación se pretende demostrar que un hongo con capacidad quitinolítica, puede por medio de la producción de enzimas, desintegrar las paredes celulares de hongos que contengan quitina en su estructura, impidiendo así su normal desarrollo. En el caso de esta investigación *Penicillium* sp. presento un porcentaje importante en la inhibición del crecimiento radial del hongo fitopatógeno causante de la enfermedad de sigatoka negra alcanzando un PICR de 67,19%.

Actualmente no se han reportado en investigaciones sobre enfrentamiento entre *Penicillium* sp. contra *M. fijensis*, pero puede convertirse en una alternativa viable digna de ser llevada a pruebas *in vivo*.

Si bien el caso de la cepa *Trichoderma* sp. utilizada en estos enfrentamientos como T4, alcanzó un mayor porcentaje de inhibición 88,76%, el hongo quitinolítico aislado se adaptaría mejor a las condiciones ambientales en donde sería utilizado, puesto que, se aisló del filoplano de la hoja del banano.

En diversos estudios se han evaluado la actividad celulolítica y quitinolítica para considerarlos como potenciales microorganismos antagonistas, esta capacidad ha sido evaluada tanto en bacterias como en hongos (Cruz *et al.*, 2000; Sánchez, 2016). Según el estudio de Urdaneta *et al* (2002) al analizar la microbiota del filoplano de banano reportó 49 hongos tanto patógenos como saprófitos, entre ellos reportó a *Penicillium* sp. En cuanto a la capacidad quitinolítica que puede tener este género reportado en el filoplano de hojas de plátano podemos analizar la investigación de Campuzano *et al* (2017) en donde se demostró que el género *Penicillium* sp. pudo hidrolizar quitina coloidal en medio mínimo hasta en 1,5 cm de diámetro en el halo de hidrólisis, se concluyó en esta investigación que este género

tiene actividad quitinolítica importante. Sobre el procedimiento de los enfrentamientos y las mediciones del PICR metodologías utilizadas para ensayos similares con la cantidad de repeticiones y muestreos correspondientes, tomamos de ejemplo la investigación desarrollada por Astorga *et al* (2014) en donde siguieron procedimientos de evaluación similares a los utilizados en esta investigación.

Algunas especies de *Penicillium* pueden causar daños importantes pudriendo frutos, pero ciertas especies pueden combatir eficazmente enfermedades en cultivos de importancia, en su trabajo de tesis doctoral presentada por Roselló (2003) se realiza un estudio de la capacidad antagónica de la especie *oxalicum* frente a *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* que causa enfermedades en el cultivo del tomate.

Para un estudio más actualizado realizado por Jiménez, Valadez y Lozoya (2018) analizaron el antagonismo de *Penicillium sp.* contra *Phytophthora capsici* (Leonian) uno de los causantes de la marchitez en el cultivo de pimiento, presentó resultados en los que sobresalieron seis cepas de este género con capacidad antagónica de los cuales se reporta degradación del micelio del hongo fitopatógeno.

Lo cual concuerda con lo observado en esta investigación en donde se rechaza la hipótesis nula planteada como “Ninguno de los tratamientos con el uso de hongos quitinolíticos aislados pudo inhibir el desarrollo de *Mycosphaerella fijensis* Morelet”. Dejando abierto los estudios de hongos quitinolíticos para controlar eficazmente la enfermedad de la sigatoka negra.

## 6. Conclusiones

Con relación a los procedimientos realizados según la metodología planteada y los resultados que consecuentemente se obtuvieron se puede concluir de la siguiente manera:

Es posible aislar del filoplano de banano hongos que tengan capacidad quitinolítica, característica que los convierte en potenciales antagonistas de enfermedades que causan gran perjuicio económico y ambiental en las plantaciones bananeras del Ecuador. El hongo aislado identificado morfológicamente como *Penicillium* sp. logró inhibir el crecimiento radial en un promedio de 67,19% del hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijensis* Morelet, siendo estadísticamente significativo en comparación con el tratamiento testigo. Por otro lado, el análisis de *Trichoderma* sp. hongo micoparásito conocido por su actividad antagónica mostró mejores resultados inhibiendo en promedio un 88,76% del crecimiento radial del hongo fitopatógeno.

Considerando que el hongo quitinolítico aislado *Penicillium* sp. fue tomado del filoplano de la hoja de banano, lugar en donde se desarrolla esta enfermedad, la capacidad antagónica del hongo aislado puede ser prometedora ya que no tendría que pasar una fase de aclimatación o adaptación al lugar donde va a ser utilizado como controlador biológico.

Durante el proceso de la investigación se logró identificar una bacteria con capacidad de degradar la quitina, la misma que fue evaluada por su potencial antagónico, la cual, no obtuvo los resultados esperados debido a que no se desarrollaba correctamente en el medio de cultivo PDA y a que la metodología para bacterias debe ser ajustada diferente al de hongos. Llegando solo a inhibir el 8,17% valor que no es estadísticamente significativo para esta investigación.

## 7. Recomendaciones

Para lograr tener éxito en una investigación con características similares se recomienda lo siguiente:

Todas las muestras recolectadas en campo sean para procesos de aislamiento o generación de cámaras húmedas deben mantenerse frescas y no debe pasar mucho tiempo desde que son recolectadas y llevadas al laboratorio.

Para las recolecciones de microorganismos vivos se deben buscar siempre cultivos que sean orgánicos, para así aumentar la probabilidad de hallar el microorganismo que se pretende encontrar.

De ser posible conseguir los materiales y reactivos con la mayor calidad posible, ya que ciertas impurezas o mala calidad de los productos pueden ocasionar resultados poco fiables.

Dentro del laboratorio se deben cumplir los reglamentos de bioseguridad y protocolos necesarios para que sea una experiencia agradable y productiva, tener cuidado con reactivos peligrosos y material cortopunzante.

Mantener el mayor grado de limpieza y cuidado en todos los procesos que requieran un ambiente esterilizado, los contaminantes son abundantes en los laboratorios por lo cual se debe desinfectar constantemente las herramientas y ser cautelosos en los procedimientos.

Redactar los protocolos a realizarse dentro del laboratorio antes de que se ingrese al mismo, para aprovechar mejor el tiempo de cada uno de los procesos.

## 8. Bibliografía

- Aguirre , M., Castaño, J., y Zuluaga, L. (2003). Método rápido de diagnóstico de *Mycosphaerella musicola* Leach y *M. fijensis* Morelet, agentes causantes de las sigatocas amarilla y negra. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 27(105), 619-624.
- Arteaga, T. (2017). Estudio de concentración de pesticidas en aguas residuales de 10 fincas bananeras en las provincias de Los Ríos y Guayas, y su incidencia en los cuerpos de agua dulce. *Tesis de Maestría*. ESPOL, Guayaquil, Ecuador. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/102822/D-CD102873.pdf>
- Asamblea Constituyente del Ecuador. (2008). Constitución del Ecuador. 138. Ecuador. Obtenido de [https://www.oas.org/juridico/mla/sp/ecu/sp\\_ecu-int-text-const.pdf](https://www.oas.org/juridico/mla/sp/ecu/sp_ecu-int-text-const.pdf)
- Astorga , K., Meneses , K., Zúñiga, V., Brenes, J., y Rivera, W. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma sp.* y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*, 27(2), 82-91.
- Ayala, A., Colina , M., Rosales , L., y Cárdenas, H. (2014). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella fijensis* Morelet que produce la sigatoka Negra que ataca el plátano. *Revista Latinoamericana de Polímeros*, 15(6), 312-338. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/281836441>
- Barrera, J., Combatt, E., y Ramírez, Y. (2011). Efecto de abonos orgánicos sobre el crecimiento y producción del plátano Hartón (Musa AAB). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 186-194.
- Borja, J. (2016). La producción de banano bajo el sistema de comercio justo: un análisis del caso ecuatoriano. *Revista Siembra*, 3(1) 07-10.

- Cabra, T., Rodríguez, C., y Villota, C. (2014). Capacidad antagónica y quitinolítica de microorganismos aislados de residuos de higuera (*Ricinus communis*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), 56-61. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n1/v12n1a07.pdf>
- Campuzano, S., Urquijo, L., y Valderrama, J. (2017). Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *Rhizoctonia solani*. *NOVA*, 15(28), 45-55. Obtenido de <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/568/938>
- Capa, L., Alaña, T., y Benítez, R. (2016). Importancia de la producción de banano orgánico. Caso: Provincia El Oro, Ecuador. *Universidad y Sociedad*, 8(3), 64-71. Obtenido de <https://rus.ucf.edu.cu/index.php/rus>
- Carr, C., Villalta, R., Rodríguez, A., y Guzmán, M. (2017). Metodología para aislar de hojas de banano hongos quitinolíticos con potencial como antagonistas de *Pseudocercospora fijensis*. *CORBANA*, 63-78. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/327780065>
- Céspedes, C. (2008). *Distribución, epidemiología y manejo de la sigatoka negra en la República Dominicana*. Santo Domingo: Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales.
- Cochran, W., y Cox, G. (1974). *Diseños experimentales*. Trillas, Mexico.
- Cruz, M., Acosta, M., Roque, B., Pichardo, T., Castro, R., y Alvarado, Y. (2016). Diversidad de cepas bacterianas de la filósfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal*, 16(1), 51-61. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/510/html>

- Cruz, M., Alvarado, Y., Sánchez, C., Acosta, M., Roque, B., y Leiva, M. (2000). Control *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* con bacterias aisladas de la filosfera de banano. *Biotecnología Vegetal*, 9(1), 61-64. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/309/html>
- Cuéllar, A., Álvarez, E., y Castaño, J. (2011). Evaluación de resistencia de genotipos de plátano y banano a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet.). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 64(1), 5853-5865. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/26392/37121>
- Di Rienzo J.A., C. F. (2020). InfoStat versión 2020. FCA. Argentina: Universidad Nacional de Córdoba. Obtenido de <http://www.infostat.com.ar>
- Elbehri, A, Calberto, G., Staver, C., Hospido, A., Roibas, L., Skully, D., Siles, P., Arguello, J., Bustamante, I. y Sotomayor, A. (2015). Cambio climático y sostenibilidad del banano en el Ecuador: Evaluación de impacto y directrices de política. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i5116s.pdf>
- Escobar, D., Ossa, C., Quintana, M., y Ospina, W. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica*, 18(1), 260-266. doi:<https://doi.org/10.22517/23447214.7555>
- Espinosa , R., Torres, R., y Granda, K. (2015). Evaluación *in vitro* de aislados fúngicos y bacterianos con potencial Antagonista frente a *Fusarium* spp. *Centro de Biotecnología*, 4(1), 42-47. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/286239532>

- Food and Agricultural Organization of United Nations, FAO (2015). *Objetivos de Desarrollo Sostenible*. Recuperado el 18 de 02 de 2019, de Agricultura Sostenible: <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/overview/fao-and-post-2015/sustainable-agriculture/es/>
- Food and Agricultural Organization of United Nations, FAO (1999). Enfermedades del banano y plátano en Venezuela. Medidas de control. Venezuela.
- Fullerton, R., y Olsen, T. (1995). Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of Black Sigatoka in banana and plantain. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science*, 23(1), 39-48. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/loi/tnzc20>
- García, J., Marcillo, J., y Palacios, C. (2019). Amenazas de las manchas foliares de sigatoka (*Mycosphaerella* spp.) en la producción sostenible de banano en el Ecuador. *Revista Verde*, 14(5), 591-596. doi:10.18378/rvads.v14i4.6623
- Gonzabay, R. (2013). Cultivo de banano en el Ecuador. *Revista AFESE*, 58(1), 113-142.
- Gutiérrez, J., Villegas, V., Mira, J., y Argel, L. (2011). Evaluación de formulaciones de *Bacillus subtilis* para el control biológico de la sigatoka negra causado por *Mycosphaerella fijiensis*. Medellín, Colombia: Universidad EAFIT. Obtenido de <https://repository.eafit.edu.co>
- Guzmán, M. (2002). Situación de la sigatoka negra en Costa Rica y opciones para el manejo de la enfermedad. Cartagena de Indias, Colombia: Acorbat.
- Guzmán, M. (2013). Manejo Convencional y Alternativo de sigatoka Negra, Nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de musaceas en los trópicos. *Situación de la sigatoka negra en banano y plátano en el trópico americano*. Brasil: CORBANA. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/30>

3518393

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, INEC. (2017). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua 2017. *Banano*. Ecuador.

Jiménez, A., Valdez , E., y Héctor, L. (2018). Antagonismo de *Penicillium sp.* contra *Phytophthora capsici* (Leonian). *Rev. Fitotec. Mex.*, 41(2), 137-148. Obtenido de <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/41-2/5a.pdf>

Jones, D. (2000). Handbook of Diseases of banana, Abaca and Endset. 544. Wallingford, UK: CABI.

Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria. (07 de junio de 2017). Quito, Ecuador. Obtenido de <http://servicios.agricultura.gob.ec/transparencia/2017/Noviembre2017/Ley%Org%C3%A1nica%20de%20Sanidad%20Agropecuaria.pdf>

Ley Orgánica del Regimen de la Soberanía Alimentaria. (28 de abril de 2009). Quito, Ecuador. <https://www.soberaniaalimentaria.gob.ec/pacha/wp-content/uploads/2011/04/LORSA.pdf>

Manzo, G., Guzman, S., Rodríguez , M., y Orozco, M. (2005). Biología de *Mycosphaerella fijjensis* Morelet y su Interacción con *Musa spp.* *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 87-96. Obtenido de <https://cicy.repositorioinstitucional.mx>

Marín, D., Romero, R., Guzmán , M., y Sutton, T. B. (2003). Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. *Plant Disease*, 87(3), 208-222. doi:<https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.208>

Mena , J. (2014). Herramientas Biotecnológicas empleadas para controlar el Hongo (*Mycosphaerella fijjensis*) causante de la enfermedad sigatoka Negra en Plátano y Banano. 60-61. (D. Carvajal, Ed.) Antioquia, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Obtenido de

<https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/2755/1/54259860.pdf>

- Ministerio de Comercio Exterior. (2017). *Informe sobre el sector bananero ecuatoriano*. Quito.
- Mourichon, X., y Fullerton, R. (1992). Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. France: Fruits (Paris).
- Muñoz, C., y Vargas, E. (2006). Manejo de sigatoka negra (*Mycosphaerella Fijiensis* var. *Difformis* Morelet) en plátano cv. "Curraré" en San Carlos, Zona Norte. *Tecnología en Marcha*, 19(1), 38-52.
- Orozco, M., Orozco J., Pérez, O., Manzo, G., Farías, J., y Da Silva, W. (2008). Prácticas Culturales para el manejo de la sigatoka negra en bananos y plátanos. 33, 3, 189-196. *Tropical Plant Pathology*. Obtenido de <http://www.scielo.br/pdf/tpp/v33n3/a03v33n3.pdf>
- Pérez, L., Álvarez, J., y Pérez, M. (2003). Sigatoka negra causada por *Mychosphaerella fijiensis* Morelet en Cuba: Impacto económico, resistencia de los clones y manejo de la enfermedad. *Fitosanidad*, 7(1). Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209118077006.pdf>
- Polanco, T., Carlier, J., y Zapater, M. (2002). Diagnóstico y distribución de *Mycosphaerella* spp. en musáceas de Republica Dominicana. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. Costa Rica, 64(1), 62-66. Obtenido de <http://www.sidalc.net/repdoc/A2046e/A2046e.pdf>
- Roselló, J. (2003). Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos.

- Tesis Doctoral*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/2905/tesisUPV1934.pdf>
- Salazar , R., y Del Cioppo, J. (2015). *Ecuador: Exportación de Banano (Musa sp.) Estudio sectorial del banano ecuatoriano de exportación*. Guayaquil, Ecuador. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/309395087>
- Samuelian, S. (2016). Potential of *Trichoderma harzianum* for control of banana leaf fungal pathogens when applied with a food source and an organic adjuvant. *3 Biotech*, 6(8), 11. doi:10.1007/s13205-015-0327-0
- Sánchez, F. (2016). Importancia de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en el control biológico de enfermedades en cultivos de gran valor económico. *Bionatura*, 1(3), 135-138. Obtenido de <http://revistabionatura.com/2016.01.03.7.html>
- Sotover, R., y Simmonds. (1987). *Bananas* (Tercera ed.). New York, U.S.A: Longman Scientific and Technical.
- Stover, R. (1980). Sigatoka Leaf Spot of Bananas and Plantains. *Plant Disease Reporter*. 64(1), 750-756.
- Urdaneta , L., Delgado, A., Sosa, L., y Piñeiro, A. (2002). Micobiota del filoplano en plátano Harton (*Musa AAB*), en el municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 19(1), 96-108.
- Valverde, E., García, R., Moreno, A., y Socorro, A. (2019). Alternativas nutricionales eficientes en banano orgánico en la provincia El Oro, Ecuador. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 2(1), 151-159. Obtenido de <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA>

## 9. Anexos



Figura 14. Procesamiento de muestras recolectadas en campo Palacios, 2020



Figura 15. Peso para preparación de medios de cultivos Palacios, 2020



Figura 16. Procedimiento para el aislamiento del hongo fitopatígeno Palacios, 2020



Figura 17. Caracterización morfológica mediante el uso del microscopio  
Palacios, 2020

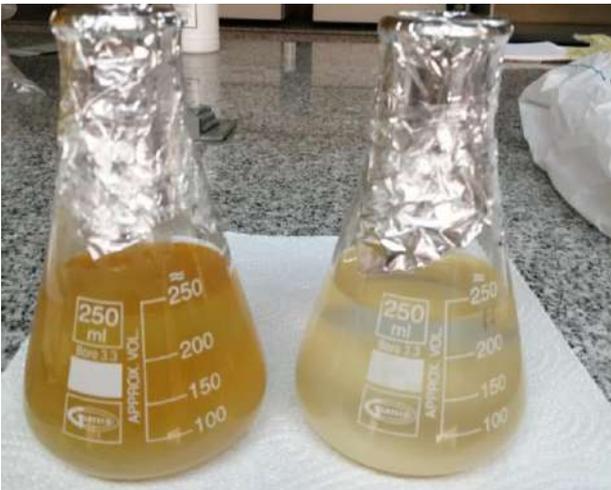


Figura 18. Esterilización de medios de cultivo  
Palacios, 2020



Figura 19. Colecta de hojas de banano con lesiones de sigatoka negra  
Palacios, 2020



Figura 20: Almacenamiento de quitina extraída Palacios, 2020



Figura 21. Preparación de solución con Tween 20 al 0,2% Palacios, 2020



Figura 22. Quitina coloidal extraída debidamente almacenada Palacios, 2020



Figura 23. Preparación de dosis de quitina coloidal para adicionar al medio Palacios, 2020



Figura 24. Corte de muestras de campo para obtener la solución madre Palacios, 2020



Figura 25. Agitación de las muestras con la ayuda de un vortex Palacios, 2020

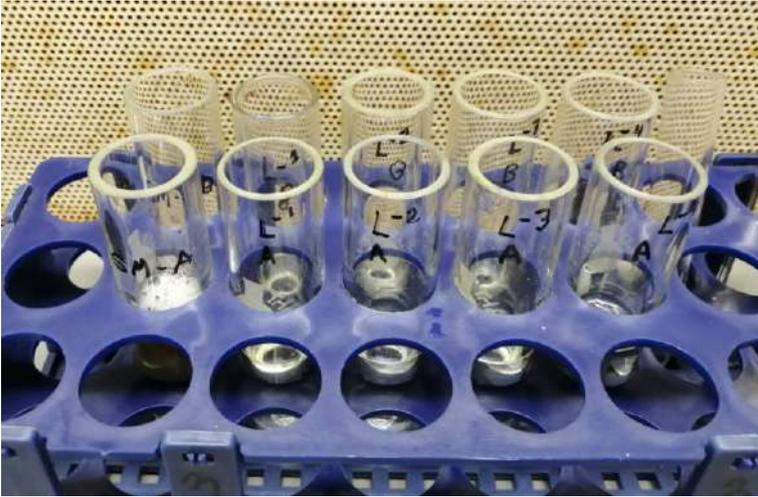


Figura 26. Diluciones seriadas realizadas Palacios, 2020



Figura 27. Diseño experimental ejecutado en las placas petri Palacios, 2020



Figura 28. Mediciones con calibrador del crecimiento radial de los hongos Palacios, 2020



Figura 29. Registro de los datos  
Palacios, 2020



Figura 30. Observaciones finales con el tutor de tesis  
Palacios, 2020

**Matriz de datos****Tabla 5. Crecimiento radial en cm**

<b>Repeticiones</b>	<b>T1</b>	<b>T4</b>
1	1,22	3,45
2	1,24	3,64
3	1,31	3,55
4	1,07	3,65
5	0,95	3,54
6	1,25	3,39
7	1,27	3,36
8	1,25	3,54
9	0,9	3,85
10	1,19	3,69

Palacios, 2020

**Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del hongo fitopatígeno en enfrentamiento con el hongo quitinolítico.**

<b>Repeticiones</b>	<b>PICR</b>
1	64,64%
2	65,93%
3	63,10%
4	70,68%
5	73,16%
6	63,13%
7	62,20%
8	64,69%
9	76,62%
10	67,75%
Promedio	67,19%

Palacios, 2020

**Tabla 7. Datos del crecimiento radial en cm de cada uno de los tratamientos**

Repeticiones	T1(cm)	T2(cm)	T3(cm)	T4(cm)
1	1,22	3,25	0,43	3,35
2	1,24	3,28	0,41	3,64
3	1,31	3,32	0,27	3,55
4	1,07	3,37	0,57	3,05
5	0,95	3,23	0,30	3,54
6	1,25	3,11	0,32	3,39
7	1,27	2,98	0,40	3,36
8	1,25	3,34	0,57	3,54
9	0,9	3,40	0,24	3,85
10	1,19	3,46	0,49	3,69

Palacios, 2020

**Análisis de la Varianza**

C:\Users\Usuario\Desktop\Datos Tesis Palacios final\_ANOVA : 26/9/2020 - 17:18:06 - [Versión : 30/4/2020]

**Tabla 8. Análisis de la varianza entre T1 vs T4**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Crecimiento radial (cm)	20	0,97	0,97	8,44

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	26,24	1	26,24	667,50	<0,0001
Tratamientos	26,24	1	26,24	667,50	<0,0001
Error	0,71	18	0,04		
Total	26,95	19			

Palacios, 2020

**Tabla 9. Análisis de la varianza entre todos los tratamientos**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Crecimiento radial (cm)	40	0,99	0,98	8,02

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	70,18	3	23,39	829,28	<0,0001
Tratamientos	70,18	3	23,39	829,28	<0,0001
Error	1,02	36	0,03		
Total	71,20	39			

Palacios, 2020

**Tabla 10. Análisis de la varianza del PICR**

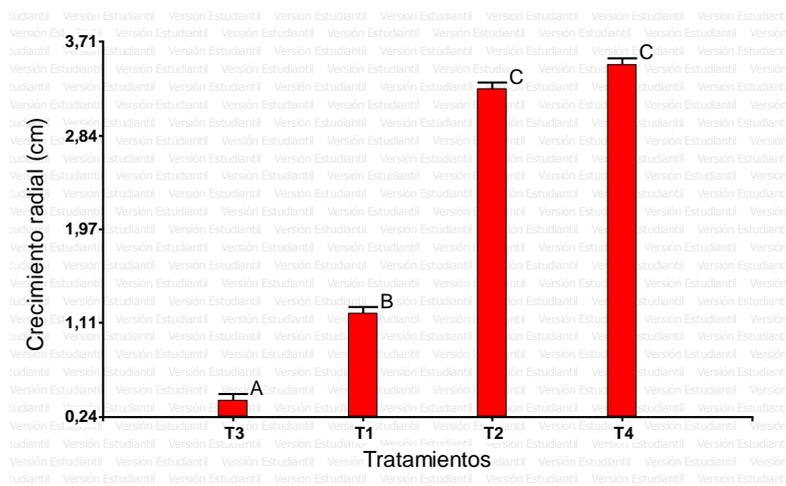
**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	30	0.99	0.99	7.08

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3.45	2	1.73	1166.09	<0.0001
Tratamientos	3.45	2	1.73	1166.09	<0.0001
Error	0.04	27	1.5E-03		
Total	3.49	29			

Palacios, 2020



**Figura 31. Gráfico del test de Tukey Alfa=0.01 Palacios, 2020**

## 9.1 Protocolos utilizados dentro del laboratorio

### 9.1.1 Protocolo para la extracción de quitina del exoesqueleto del camarón

1. Preparación de la materia prima: Preparar la cascara de camarón lavándola con agua potable por dos ocasiones, secar en un horno a 40°C por 2 horas y triturar y tamizar hasta obtener tamaños de partícula entre 0,8mm y 1.5mm.
2. Desproteínización: Las proteínas existentes fueron removidas con el uso de hidróxido de calcio (CaOH)<sub>2</sub> (Químicamente puro) en una solución al 2N en relación 1:10 sólido/líquido a 40°C en agitación constante durante 2 horas, otra alternativa sería (uso de hidróxido de sodio NaOH (Grado analítico) en una concentración al 3,5%) se procedió a filtrar y a secar el residuo en una estufa a 40°C hasta que quede completamente seco.
3. Desmineralización: La remoción del carbonato de calcio y otras sales presentes en la cascara del camarón fueron removidos mediante la inmersión de la muestra en relación 1:5 sólido/líquido en una solución de HCL al 2 N en agitación constante durante 1 hora
4. Purificación: Se realiza mediante solución de NaOH al 2% por 1 hora finalmente se estabiliza el pH con agua destilada, se filtra y se seca en estufa a 40°C hasta que esté completamente seca y de buen aspecto.

### 9.1.2 Protocolo para el aislamiento de *M. fijensis* por el método de siembra

#### directa

1. Recolección de hojas enfermas con presencia avanzada de la enfermedad, de preferencia en estadio 6
2. Incubar las hojas en bolsas de plástico a 26°C con papel humedecido por 48h en la oscuridad.
3. Cortar fragmentos de tejido de aproximadamente 15mm<sup>2</sup> de tal manera que incluyeran tejido sano y enfermo. Los fragmentos fueron lavados con agua destilada durante 45 min, y se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1% por 1 min y etanol al 70% por el mismo tiempo.
4. Los fragmentos secos se transfirieron a cajas Petri con PDA y se incubaron a 24°C durante 25 días, una vez esporulado el hongo se tomaron conidias individuales que se transfirieron a un nuevo medio.
5. Finalmente incubar los aislamientos monospóricos en las cajas petri a 24°C +-1 durante 25 días.

### 9.1.3 Protocolo para el aislamiento de hongos quitinolíticos del filoplano de banano

#### *Preparación del medio semi-selectivo.*

5. Pesar 15gr de agar-agar y 2,4gr de PDA (6,5% de la dosis usual) depositarlos en un vaso de precipitado de un litro y agregar un litro de agua destilada. Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 15 min.
6. Dentro de una cámara de flujo laminar, dejar reposar el medio de cultivo hasta que su temperatura alcance 50-55°C y en ese momento añadir la quitina (10ml L<sup>-1</sup>) para evitar la desnaturalización.
7. Ajustar el pH a 4,5-5 con NaOH

#### *Aislamiento.*

1. Las muestras se deben identificar y mantener en refrigeración no es conveniente dejar pasar más de 48h después de las colectas en campo.
2. Preparar una suspensión madre seleccionando 20 discos de hoja de 10mm de diámetro con presencia de lesiones y evidencia del crecimiento de un hongo diferente a *M. fijensis*.
3. Los discos se colocan en un tubo de ensayo de 20ml de capacidad que contenga 10ml de agua destilada con Tween 20 al 0,2%.
4. Se agitan por dos minutos con la ayuda de un vortex, se dejan reposar durante 1 hora y luego se vuelve a agitar por un minuto.
5. De la solución madre se realiza diluciones seriales hasta 10<sup>-4</sup> en agua destilada. De la última dilución tomar una alícuota de 0,2ml y de distribuye sobre el medio con la ayuda de un asa.
6. Se incuban los platos Petri en la oscuridad a 26°C durante 7 días con observaciones periódicas.

#### *Purificación de los aislamientos.*

1. Los hongos que formen un halo traslucido, evidencia de algún tipo de enzima quitinolítica se aíslan y se purifican.
2. También se puede seleccionar otros hongos o bacterias que muestren alguna característica de interés, como producción de pigmentos o inhibición de crecimiento de otros hongos alrededor.