



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR

**ESCUELA DE POSTGRADO “DR. JACOBO BUCARAM
ORTIZ”**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL
COHORTE 2023**

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

**EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS EN
EL CONTROL DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella
fijiensis* M. Morelet) EN EL CULTIVO DE BANANO (*Musa
acuminata* x *M. balbisiana*)**

ING. AGR. DANILO RAMIRO VALDEZ RIVERA

GUAYAQUIL - ECUADOR

2024

ESCUELA DE POSGRADO “ING. JACOBO BUCARAM ORTIZ, PHD”

CERTIFICACIÓN

El suscrito, docente de la universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Director Certifico que: he revisado el trabajo de titulación denominada: “**EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS EN EL CONTROL DE SIGATOKA NEGRA** (*Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet) **EN EL CULTIVO DE BANANO** (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*)”, el mismo que ha sido elaborado y presentado por el estudiante, Ing. Danilo Ramiro Valdez Rivera, quien cumple con los requisitos técnicos y legales exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador para este periodo de estudios.

Atentamente:

Ing. Simón Farah Asang, MSc

Guayaquil, 22 de mayo del 2024

UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
ESCUELA DE POSGRADO “ING. JACOBO BUCARAM
ORTIZ, PHD”

EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS EN EL
CONTROL DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis* M.
Morelet) EN EL CULTIVO DE BANANO (*Musa acuminata* x M.
***balbiana*)**

AUTOR

ING. AGR. DANILO RAMIRO VALDEZ RIVERA

TRABAJO DE TITULACIÓN

APROBADA Y PRESENTADA AL CONSEJO DE POSGRADO
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN SANIDAD VEGETAL

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

ING. FREDDY GAVILANÉZ LUNA, PHD.
PRESIDENTE

ING. CAROLINA PAZ YÉPEZ, PHD.
EXAMINADOR PRINCIPAL

ING. SIMÓN FARAH ASANG, MSc
EXAMINADOR PRINCIPAL

AGRADECIMIENTO

Agradezco a nuestro Señor Jesús por su infinita misericordia para este servidor, a mi madre Gladys Rivera, a mi esposa Alexandra Moreira a mis hijos Jonathan, Erick y Anahí, por su amor y cariño.

Al Dr. Jacobo Bucaram Ortiz a quien he admirado desde que lo conozco por su inteligencia, carácter y resiliencia frente a todos los obstáculos que ha tenido en su vida. Tuvo un sueño que lo hizo realidad creó la prestigiosa “UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR”.

Al voluntariado de la Universidad Agraria del Ecuador, dirigido por una excelente profesional Licenciada Beatriz Bucaram Leverone quien siempre está ayudando a los alumnos de maestría y pregrado.

A la Universidad Agraria del Ecuador por permitirme ser parte de esta prestigiosa Alma Mater, de los misioneros del Agro. A los docentes de la maestría quienes aportaron con sus enseñanzas y conocimientos en su área de experticia, a mi tutor Ing. Simón Farah Asang, MSc, pilar fundamental para culminar el trabajo de titulación.

DEDICATORIA

Rindo un homenaje póstumo a mi querido papá Félix Arquímedes Valdez Carcelén, quien me enseñó el valor de estudiar y siempre ser el mejor en mi desempeño laboral.

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. Danilo Ramiro Valdez Rivera

CI 0912908803

RESUMEN

Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), es un patógeno que afecta el área foliar de las plantas de banano, afectando la capacidad fotosintética así mismo los rendimiento y calidad de la fruta se merman. La presente investigación se la realizó en la ciudad de Guayaquil, en condiciones controladas y semicontroladas. El objetivo de la investigación fue analizar microorganismos antagonistas *Trichoderma spp* y *Bacillus spp* para el control de sigatoka negra en el cultivo de banano (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*). En pruebas dual in vitro se evaluó el porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) y en condiciones semicontroladas la eficacia de los microorganismos antagonista sobre el índice de infección y severidad de sigatoka negra. *Bacillus spp* mostró un PICR de 33.75% sobre *Mycosphaerella fijiensis*, y *Trichoderma spp.*, presentó un 11,67% de inhibición contra el patógeno. En cuanto a la severidad, los tratamientos evaluados en plantas de banano indican severidad baja con valores que oscilaron entre. *Bacillus spp* registró 8.33% menos severidad que el testigo absoluto con 22.57%, En cuanto al Promedio ponderado de infección (PPI), los valores muestran que hay muy baja incidencia de la infección, no hay diferencias estadísticas entre tratamientos. Se concluye que el uso de un consorcio microbiano de *Trichoderma spp* junto a *Bacillus spp.*, realizan una sinergia positiva en la planta de banano con características de biocontrol de enfermedades.

Palabras claves: Banano, Microorganismos antagonistas, sigatoka negra.

SUMMARY

Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) is a pathogen that affects the leaf area of banana plants, affecting the photosynthetic capacity and the yield and quality of the fruit are reduced. The present investigation was carried out in the city of Guayaquil, under controlled and semi-controlled conditions. The objective was to analyze antagonistic microorganisms for the control of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet) in banana crops (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*). In dual in vitro tests, a Completely Randomized Design (DCA) was used and in semi-controlled conditions, a Latin Square Design with two replicates (LCD). The effectiveness of the application of *Trichoderma* spp and *Bacillus* spp on the infection rate and severity of black Sigatoka was evaluated in vitro and in semi-controlled conditions. *Bacillus* spp showed a PICR of 33.75% on *Mycosphaerella fijiensis*, and *Trichoderma* spp., presented 11.67% inhibition against the pathogen. Regarding severity, the treatments evaluated on banana plants indicate low severity with values that ranged between 14.24 to 22.57%. *Bacillus* spp registered 8.33% less severity than the absolute control. Regarding the Weighted Average Infection (PPI), the values show that there is a very low incidence of infection, there are no statistical differences between treatments. It is concluded that the use of a microbial consortium of *Trichoderma* spp together with *Bacillus* spp., creates a positive synergy in the banana plant with disease biocontrol characteristics.

Keywords: Banana, Antagonistic microorganisms, black Sigatoka.

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| Caracterización del tema | 2 |
| Planteamiento de la situación problemática..... | 2 |
| Justificación e importancia del estudio | 2 |
| Delimitación del problema..... | 2 |
| Objetivos | 3 |
| Objetivo General..... | 3 |
| Objetivos específicos | 3 |
| Hipótesis o idea para defender | 3 |
| CAPITULO 1 | 4 |
| MARCO TEORICO | 4 |
| 1.1 Estado del arte..... | 4 |
| 1.2 Bases científicas y teóricas de la temática | 6 |
| 1.2.1 Generalidades del cultivo de banano | 6 |
| 1.2.3 Taxonomía | 6 |
| 1.2.4 Importancia del cultivo de banano..... | 6 |
| 1.2.5 Enfermedad del banano Sigatoka negra | 7 |
| 1.2.6 Taxonomía | 8 |
| 1.2.7 Los fungicidas para el control de enfermedades en el cultivo de banano | 8 |
| 1.2.8. Prácticas culturales en el manejo de Sigatoka negra | 8 |
| 1.2.9 Microorganismos antagonicos de patógenos | 9 |
| 1.2.10 Protocolo para la inoculación artificial de plantas de <i>Musa</i> spp con <i>Mycosphaerella fijiensis</i> | 10 |
| 1.3 Marco legal..... | 12 |
| CAPITULO 2 | 14 |
| ASPECTOS METODOLÓGICOS | 14 |
| 2.1 Métodos..... | 14 |
| 2.1.1 Modalidad y tipo de investigación | 14 |
| 2.2 Variables | 14 |
| 2.2.1 Variable independiente: | 14 |
| 2.2.2 Variables dependientes: | 14 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2.1 Condiciones controladas..... | 14 |
| Prueba de antagonismo,..... | 14 |
| Tiempo que transcurre crecimiento de microorganismos, | 15 |
| Tiempo de evolución de los síntomas..... | 15 |
| Índice de infección. | 15 |
| Evaluación de severidad: | 15 |
| Frecuencia de muestreo | 15 |
| Emisión foliar: | 15 |
| 2.2.3 Operacionalización de Variables | 16 |
| 2.3 Población y muestra | 17 |
| 2.4 Técnica de recolección de datos | 17 |
| 2.4.1 Métodos y técnicas | 17 |
| 2.4.1.2 Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> en condiciones semicontroladas.. | 17 |
| 2.4.1.3 Inoculación y evaluación | 18 |
| 2.5 Estadística descriptiva e inferencial..... | 18 |
| 2. 6 Diseño experimental | 18 |
| 2.6.1 Tratamientos | 19 |
| 3. RESULTADOS..... | 21 |
| DISCUSION | 24 |
| CONCLUSIONES | 26 |
| RECOMENDACIONES | 27 |
| BIBLIOGRAFIA CITADA..... | 28 |
| Apéndice | 43 |

ÍNDICE DE CUADRO

| | |
|--|----|
| Cuadro N° 1: Operacionalización de las variables | 16 |
|--|----|

ÍNDICE DE APÉNDICE

| | |
|--|----|
| Apéndice No 1. Porcentaje de infección y severidad externa de sigatoka negra de banano | 43 |
| Apéndice No 2. Análisis de varianza para la variable Promedio Ponderado de Infección (PPI)..... | 43 |
| Apéndice No 3. Análisis de varianza para la variable severidad externa | 44 |
| Apéndice No 4. Análisis de varianza para la variable número hojas | 44 |
| Apéndice No 5. Esquema del ensayo in vivo bajo un diseño Cuadrado Latino Replicado (DCLR). | 45 |
| Apéndice No 6. Matriz de datos de la variable crecimiento radial <i>in vitro</i> | 45 |
| Apéndice No 7. Matriz de datos de la variable severidad externa..... | 46 |
| Apéndice No 8. Matriz de datos de la variable promedio ponderado de infección PPI | 46 |
| Apéndice No 9. Matriz de datos de la variable número de hojas..... | 46 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| ANEXO No 1. Escala de evolución de los síntomas de Sigatoka negra según fouré (1985) citado por (Cedeño et al. 2017)..... | 34 |
| Anexo No 2. Escala evolutiva para la evaluación del desarrollo de los síntomas en hojas de <i>Musa</i> spp. Inoculadas con <i>Mycosphaerella fijiensis</i> | 34 |
| ANEXO No 3. Recolección de hojas enfermas de Sigatoka negra..... | 35 |
| ANEXO No 4. Inoculación de plantas de banano de 16 semanas 3 días antes de inoculación de Sigatoka negra, con <i>Trichoderma</i> spp y <i>Bacillus</i> spp..... | 35 |
| ANEXO No 5. Inoculación de Sigatoka negra a plantas de banano, en las 3 primeras hojas..... | 36 |
| Anexo No 6. Cepa de <i>P. fijiensis</i> , conseguida en Cebioca..... | 36 |
| ANEXO No 7. Preparación de cajas Petri para pruebas dual..... | 37 |
| Anexo No 8. Prueba dual Sigatoka negra vs <i>Bacillus</i> spp..... | 37 |
| Anexo No 9. Tratamientos, prueba dual Sigatoka negra vs <i>Bacillus</i> spp, Sigatoka negra vs <i>Trichoderma</i> spp. Testigo absoluto (Sigatoka negra) | 38 |
| Anexo No 10. Prueba dual, <i>Trichoderma</i> spp vs <i>M. fijiensis</i> a los 8 dda..... | 38 |
| Anexo No 11. Plántulas de banano..... | 39 |
| Anexo No 12. Evaluación de infección de sigatoka negra..... | 39 |
| Anexo No 13. Evaluación de Infección de Sigatoka negra..... | 40 |
| Anexo No 14. Etiqueta <i>Bacillus</i> spp | 40 |
| Anexo No 15. Etiqueta <i>Trichoderma</i> spp..... | 41 |
| Anexo No 16. Ficha técnica de cepa de <i>P. fijiensis</i> | 41 |
| Anexo N° 17. Seguimiento del tutor | 42 |

INTRODUCCION

El banano es considerado una fuente de ingreso, bienestar económico, seguridad alimentaria y nutricional en zonas rurales de países en desarrollo, llegando a alcanzar producciones de 135 millones de toneladas en el 2028, encontrándose entre las frutas tropicales más cultivadas, alcanzando el 53% del total de la producción mundial de frutas para el año antes mencionado (FAO 2020).

El cultivo de banano en el Ecuador representa el 17,4% al VAB Agropecuario, generando divisas que alcanzan USD 3,272 millones. Europa es el principal consumidor de esta fruta con 28.1%, seguido por Rusia y Estados Unidos con 20.8% y 11.5% respectivamente; representando 18.1 de las exportaciones no petroleras. Las principales provincias productoras de banano son: Los Ríos, Guayas y El Oro, con una superficie sembrada a nivel nacional de 164.085 ha. (SIPA 2023a).

Sigatoka negra es una enfermedad que afecta el área foliar causando daños a las hojas, la capacidad fotosintética se ve afectada y como consecuencia disminuye el rendimiento, merma la calidad de la fruta e incluso el cultivo se ve afectado si no se toman los correctivos necesarios. Este hongo se reproduce de forma asexual y sexual, su síntoma empieza con unos puntos pardos que se convierten en estrías amarillas la cual es beneficiada por las lluvias donde hay más presión de la enfermedad. En la fase sexual las ascoporas son las encargadas de que la enfermedad se disemine en grandes extensiones por las lluvias y el viento principalmente (FAO s. f.).

Trichoderma harzianum es uno de los microorganismos más usado por su amplio rango de antagonismo contra patógenos de las plantas (hongos y nematodos) y por su novedoso interacción con la planta.(Singh, Singh, y Prabha 2016). Se ha encontrado que *Trichoderma harzianum* tiene potencial para controlar hongos patógenos de la hoja cuando se aplican con una fuente de alimento y coadyuvante orgánico (Samuelian 2016).

Caracterización del tema

La aplicación de pesticidas en plantaciones de banano es alta y en época lluviosa los ciclos de fungicidas se acortan por las condiciones ambientales, humedad relativa arriba de 90% por tiempo prolongado son favorable para el desarrollo del hongo *Mycospharella fijiensis*. Esta carga química afecta la microbiota del suelo, la biodiversidad del ecosistema contamina las fuentes de agua, la vida acuática, la salud de trabajadores, y riesgo de residuos en fruta. El uso de *Trichoderma* spp., será una alternativa para que los agricultores bananeros usen microorganismos antagónicos para el control de enfermedades de la hoja y bajen la carga química a la que está sometida el cultivo de banano.

Planteamiento de la situación problemática

El uso excesivo de pesticidas para el control de enfermedades ha hecho que muchos de estos pierdan eficacia en el control de sigatoka negra; elevando los costos de producción y colocando en una posición de riesgo químico tanto al medio ambiente, salud de los trabajadores y consumidores de esta fruta. El sector bananero busca bajar costos, elevar la productividad, mejorar la calidad de la fruta y obtener precios competitivos acorde al mercado internacional.

Justificación e importancia del estudio

Los microorganismos benéficos son una alternativa agroecológica que tiene el sector agrícola, numerosas investigaciones avalan la eficacia al controlar insectos, bacterias y hongos patógenos. En este contexto los microorganismos tienen diversos mecanismos de acción al controlar plagas y enfermedades; por competencia, espacio, alimento, antibiosis, inducción de resistencia y otras.

Con los antecedentes expuestos se busca controlar Sigatoka negra en plantaciones bananeras del país con una alternativa agroecológica sostenible y sustentable, buscando siempre mejorar la calidad de vida de las personas involucradas en este sector productivo de mucha importancia en la economía del país por ser fuentes de trabajo y de divisas.

Delimitación del problema

La presente investigación se llevó a cabo en condiciones controladas en la provincia del Guayas con la siguiente ubicación geográfica UTM: 17M X:

621435.76092408 Y: 9756142.6466462. Con una duración de 6 meses, y se beneficiar los agricultores de la provincia del Guayas, productores bananeros en general.

Formulación del problema

¿La aplicación de microorganismos entomopatógenos *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp controlará Sigatoka negra *Mycosphaerella fijiensis* en el cultivo de banano?

Objetivos

Objetivo General

Analizar microorganismos antagonistas para el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet) en el cultivo de banano (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*).

Objetivos específicos

Evaluar el efecto antagónico *in vitro* de sigatoka negra frente a *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp., en condiciones semi controladas.

Estimar la severidad de la aplicación de *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp., sobre sigatoka negra en condiciones de semicontroladas.

Determinar el desarrollo vegetativo a la aplicación de microorganismos en los diversos tratamientos de estudio.

Hipótesis o idea para defender

La aplicación de microorganismos antagonistas *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp., reducirá la severidad de *M. fijiensis* en las plántulas de banano.

CAPITULO 1

MARCO TEORICO

1.1 Estado del arte

El cultivo de banano en el Ecuador representa el 17,4% al Valor Agregado Bruto (VAB) Agropecuario, generando divisas que alcanzan USD 3,272 millones. Europa es el principal consumidor de esta fruta con 28.1%, seguido por Rusia y Estados Unidos con 20.8% y 11.5% respectivamente; representando 18.1 de las exportaciones no petroleras. Las principales provincias productoras de banano son: Los Ríos, Guayas y El Oro, con una superficie sembrada a nivel nacional de 164.085 Ha (SIPA 2023a)

Para entender las interacciones que tiene el *Trichoderma spp.*, con las raíces se realizaron estudios con *T. virens* y las raíces de plátano. Concluyendo que tienen interacción y esta desencadena una producción de un secretoma específico del hongo aumentando la inmunidad de la planta frente a patógenos invasivos, mediante técnicas de análisis proteómico identificaron que 27 proteínas estaban reguladas positivamente cuando entran en contacto con las raíces de banano, mejorando la resistencia natural de la planta frente a hongos patógenos (Muthukathan et al. 2020).

Se ha demostrado que *T. harzianum* es un agente de control ampliamente estudiado con un gran potencial para su uso en agricultura sostenible, promueve el crecimiento de las plantas y mejora la tolerancia al estrés abiótico de los cultivos (Cortes et al. 2023; Hernández-Melchor et al. 2019). Es considerado un componente predominante de varios microbiomas del ecosistema del suelo, con capacidad de colonizar las raíces de las planta (Tyśkiewicz et al. 2022).

Investigaciones realizadas con *T. virens* y *T. harzianum* para evaluar el efecto bioestimulante de estos hongos endófitos, determinaron que tiene potencial para mejorar la productividad, calidad nutricional y resistencia a patógenos de las plantas y estrés ambiental en condiciones óptimas y subóptimas de niveles de nitrógeno(N) en dos hortalizas de hojas: lechuga. Iceberg lechuga (*Lactuca sativa* L.) y rucula lechuga (*Eruca sativa* Mill.). El rendimiento, características nutricionales, absorción de nitrógeno(N) y la composición mineral se analizaron

para cada cultivo de hortaliza, después de la inoculación de *Trichoderma* spp., las cuales aumentaron significativamente el rendimiento, aumentó la eficiencia del nitrógeno incluso cuando se sembró con niveles bajo de nitrógeno (Fiorentino et al. 2018).

Según (Moreira, Cairo, Borges, L. D. D. Silva, et al. 2021), concluyó que combinaciones específicas de suelo, sustrato orgánico e inoculaciones de *Bacillus* spp, junto a *T. asperellum*, optimiza el crecimiento y el contenido de nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, en plántulas de plátano.

T. viride, inhibió las esporas de *Plasmodiophora brassicae*. en el cultivo de pak choi, proporcionando un potencial prometedor para suprimir la enfermedad de raíz en este cultivo, redujo la agalla de la enfermedad y mejoró la biomasa en plantas infectadas con *P brassicae*. (Arif et al. 2023).

El uso de microorganismos como el *Trichoderma* spp y bacterias como *Bacillus* spp., tiene un efecto positivo en los cultivos, su combinación posee un potencial como promotor de crecimiento y agente biocontrolador, sin embargo esta sinergia necesita más investigación para determinar los mecanismos específicos de biocontrol convirtiéndose en una alternativa prometedor , para el manejo de los cultivos y el control de plagas y enfermedades en la agricultura moderna (Poveda y Eugui 2022a)

Estudios realizados por (Azeem et al. 2022), usando *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* identificados por secuencia genética, reveló que estas bacterias tienen capacidad de sobrevivir en melaza por alrededor de tres meses. Tienen acción fungicida de amplio espectro, y acción promotora de crecimiento de las plantas en diferentes cultivos, incluido maíz, trigo y patata.

El género *Bacillus* es un grupo de bacterias que ha sido utilizado para el control de enfermedades y plagas en las plantas incluyendo *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*. La habilidad que tienen estas bacterias para producir enzimas y metabolitos secundarios es una buena opción para el control de patógeno en cultivos como tomate, maíz, arroz, papa, trigo entre otros(Villarreal-Delgado et al. 2018) (Blake, Christensen, y Kovacs 2020).

La sigatoka negra causada por *M. fijensis* es la enfermedad más grave en el mundo, en Brasil investigaron 29 aislados de *Trichoderma* spp., para el control de esta enfermedad y cuatro aislados fueron capaces de reducir la gravedad de la enfermedad y solo *T. atroviride* fue eficaz como el fungicida azoxistrobin (Cavero et al. 2015).

1.2 Bases científicas y teóricas de la temática

1.2.1 Generalidades del cultivo de banano

El banano es originario del sudeste de Asia y constituía un alimento comestible muy importante en esa región, los datos más antiguos que se conocen del plátano datan de los años (600-500 AC) en la India, pero el cultivo existía en el país desde muchos milenios, (Reynold, 1951, como se citó en (Alcivar 2015).

Según la base de datos mundial de la fiscalía europea (Código EPPO)

Código EPPO: MUBPA
Nombre preferido: Musa x paradisiaca
Autoridad: Linnaeus

Tabla N° 1. Otros nombres científicos del banano

| Nombre | Autoridad |
|--------------------------------|-----------|
| Musa acuminata x M. balbisiana | |
| Musa paradisiaca | Linnaeus |
| Musa sapientum | Linnaeus |

Nota. Tomado de (Anón 2023).

1.2.3 Taxonomía

Reino Plantae (1PLAX)
Filo Magnoliophyta (1POP)
Clase Angiopermas (1ANGC)
Categoría Commelinidos (1COMD)
Orden Zingiberales (1ZINO)
Género Musa (1MUSF)
Especie Musa paradisiaca (MUBPA) (Anón 2023).

1.2.4 Importancia del cultivo de banano

El banano se cultiva en todas las regiones tropicales, es muy importante para la economía de los países en desarrollo, es el cuarto cultivo más importante del mundo en términos alimentario, después del arroz, trigo y maíz. El banano es un

alimento básico ya que contribuyen en gran medida a la seguridad alimentaria de millones de personas en el mundo, dando trabajo e ingresos económicos en la población rural en países que se dedican a sembrar y exportar esta fruta (Pedro Arias et al. s. f.).

El banano ecuatoriano representa el primer país exportador con 29% de la producción mundial junto a Costa Rica 9%, Filipinas 9% y Guatemala con el 8%. Con una superficie sembrada de 167.544 Ha, repartidas en las provincias del Guayas, Los Ríos, El Oro, Cotopaxi, Cañar, Loja y otros. Con un rendimiento de 36.28 T/ha. Contribuyó con el 17.4% el valor agregado bruto (BAV) agropecuario, participando con el 14.4% en las exportaciones no petroleras en el año 2022 (SIPA 2023b).

1.2.5 Enfermedad del banano Sigatoka negra

La sigatoka negra en su ciclo de vida tiene dos estados uno telemorfo o sexual y otro anamorfo o asexual. *M. fijiensis* es telemorfo y *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton es el anamorfo (Mulder & Estover. 1976; Marin et al. 2003: citado por (Orozco-Santos et al. 2008). De hecho *M. fijiensis* produce ascosporas en el interior de pseudotecios sobre lesiones maduras y representa la principal fuente de inóculo de la enfermedad en cambio *P. fijiensis* forma conidios en lesiones jóvenes” (Estover, 1980; Marin et al., 2003; citado por (Orozco-Santos et al. 2008).

Según la base de datos mundial de la fiscalía europea (Código EPPO)

Código EPPO: MYCOFI

Nombre preferido: *Pseudocercospora fijiensis*

Autoridad: (Morelet) Deighton

Tabla N° 2. Otros nombres científicos de Sigatoka negra

| Nombre | Autoridad |
|---|--------------------|
| <i>Cercospora fijiensis</i> | Máslet |
| <i>Mycosphaerella fijiensis</i> | Máslet |
| <i>Mycosphaerella fijiensis</i> var. <i>difformis</i> | Mulder & Stover |
| <i>Paracercospora fijiensis</i> | (Morelet) Deighton |

Nota. Tomado de (Anón s. f.)

1.2.6 Taxonomía

| | |
|-----------------|---|
| Reino | Hongos (1FUNGK) |
| Filo | Ascomicota (1ASCOP) |
| Subfilo | Pezizomycotina (1PEZYQ) |
| Clase | Dothideomycetes (1DOTHC) |
| Subclase | Dothideomycetidae (1DTHDL) |
| Orden | Mycosphaerellaceae (1MYCOF) |
| Género | <i>Pseudocercospora</i> (1PSCSG) |
| Especie | <i>Pseudocercospora fijiensis</i> (MYCOFI) (Anón s. f.) |

El cambio climático tiene la capacidad de interactuar entre plagas, enfermedades y huéspedes humanos, animales y vegetales, algunas investigaciones han proyectado cambio en la distribución de enfermedades como la de sigatoka negra en bananeras de América Latina y el Caribe, encontrando que el riesgo de infección a aumentado en una mediana del 44.2%, desde la década de 1960, esto se debe al aumento de la temperatura y humedad, condiciones favorables para que se desarrolle la enfermedad (Bebber 2019).

1.2.7 Los fungicidas para el control de enfermedades en el cultivo de banano

Investigación realizada en Machala-Ecuador por Guerrero (2018) determinó que la frecuencia de aplicación, dosificación correcta y rotación de fungicidas por familia química es de importancia para el control de sigatoka negra, además hacen énfasis en que las fincas que usaron proporción 50/50 de fungicidas sistémico y protectante presentaron mayor número de hojas funcionales y una menor carga química en la fruta, cabe resaltar que en las fincas evaluadas se realizaron 41 y 54 ciclos al año.

1.2.8. Prácticas culturales en el manejo de Sigatoka negra

Las prácticas culturales realizadas en el cultivo de banano es fundamental para el manejo de la enfermedad, de hecho luego de la aplicación de fungicidas o productos de carácter biológico es necesario realizar el deshoje (Vargas et al. 2009), cirugía y poda temprana. Labores que son importantes para mantener bajo el inóculo; así como fertilización balanceada, descomposición de desechos, drenaje del cultivo, riego, control de plagas y otras labores que contribuyan a

mantener plantas vigorosas (Etebu y Young-Harry 2011; Orozco-Santos et al. 2008; Vázquez-Euán et al. 2019).

1.2.9 Microorganismos antagónicos de patógenos

T. viride se considera uno de los agentes más prometedor y efectivos para controlar una amplia lista de enfermedades de las plantas, así como fomentar el crecimiento de estas. Demostrando tener amplia actividad anti microbiana, ejerciendo una actividad inhibitoria de crecimiento micelial de *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Awad et al. 2018; Ferreira y Musumeci 2021).

Estudios realizados por Samuelian (2016), sobre antagonismo de *T. harzianum* y *T. virens*, contra patógeno de *Mycosphaella musicola*, tiene un potencial prometedor para combatir los patógenos presentes en las hojas de banano, combinando con una fuente de alimento y un adyuvante orgánico, que aumentó la eficacia (Manoharachary, Singh, y Varma 2020). Sugiere la posibilidad de usar esta estrategia como alternativa sostenible y sustentable, con el medio ambiente en el manejo de enfermedades de banano.

T. harzianun 1×10^9 en aplicaciones de 5 litros/ha, cada 15 días, controló sigatoka negra, no hubo significancia estadística con el control químico, produciendo un efecto bioestimulante ya que la media en crecimiento foliar tuvo un aumento en relación con el tratamiento absoluto (Castro et al. 2015).

Aplicaciones de *B. subtilis* EA CB0015 y sus metabolitos tuvieron éxitos al controlar Sigatoka negra en invernadero y campo, siendo tan efectivo como los fungicidas cloratolonil y mancozeb (Gutierrez-Monsalve et al. 2015).

Investigaciones realizadas con *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp, ajustada a una concentración de 1×10^7 UFC/ml, sugiere que es posible sustituir 25% de fungicidas convencional en programas de control de sigatoka negra en el cultivo de banano en época seca y lluviosa (Becker, Esker, y Umaña 2021).

B. subtilis es una bacteria notablemente diversa que muestra muchas funciones ecológicas. Dada su diversidad genómica, la cepa *B. subtilis* EA-CB0575, aislada de la rizosfera de una planta de banano, fue secuenciada y ensamblada para determinar el potencial genómico asociado con su potencial de promoción del crecimiento vegetal. Los genes implicados en la producción de indoles, sideróforos,

lipopéptidos, compuestos volátiles, fitasa, bacilibaptina y nitrogenasa se predijeron mediante anotación génica o mediante predicción de la vía metabólica por RAST. Estos rasgos potenciales se determinaron mediante pruebas bioquímicas in vitro, encontrando que *B. subtilis* EA-CB0575 produce dos familias de lipopéptidos (surfactina y fengicina), solubiliza fosfato, fija nitrógeno y produce compuestos de indol y sideróforos; (Blake et al. 2020; Wang et al. 2018).

Evaluaciones realizadas para entender el mecanismo de protección a las plantas de banano (*Musa* AAA cv. Willians) de un producto a base de *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 contra la severidad de *P. fijiensis*, confirma que los lipopéptidos reducen significativamente la gravedad de la enfermedad, colonizando las células bacterianas en la superficie foliar de las plantas de banano inoculadas con *P. fijiensis*, implicando una interacción directa a través de la antibiosis y una interacción indirecta compitiendo por nutrientes y espacio (Cuellar-Gaviria, González-Jaramillo, y Villegas-Escobar 2021)

La introducción de microflora bacteriana benéfica en la rizosfera o más conocida como “ingeniería de la rizosfera” es un componente importante para remodelar la microflora del suelo ya que este protegerá a la planta huésped contra infecciones de patógenos. *Trichoderma* spp., se ha usado ampliamente para controlar enfermedades del maíz sin embargo el mecanismo de resistencia sistémica inducido contra enfermedades del maíz aún se desconoce (Sharma y Sharma 2020). *T. harzianum* el beneficio para las plantas incluye inmunidad innata mejorada, aumenta los niveles de ácido salicílico, ácido jasmónico, y fitoalexina en las planta, confiere protección contra una gama de patógenos foliares (Contreras-Cornejo et al. 2014). Así mismo tienen un papel importante en la tolerancia al estrés biótico y abiótico, el crecimiento hifal y la promoción del crecimiento de las plantas (Singh et al. 2014).

1.2.10 Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp con *Mycosphaerella fijiensis*.

Preparación del material vegetal:

Se sugiere usar material vegetativo de *musa* spp., de cultivo in vitro, por la homogeneidad del material vegetativo, a climatizar las plantas por 30 días, mantener y cambiar de bandejas mínimo 20 cm de altura y que tenga al menos 3

hojas activas, colocar las plantas en un área de inoculación una semana antes de inocular. Realizar previo a la inoculación una poda de saneamiento, para eliminar cualquier daño mecánico o porciones de la hoja que tenga daños por plagas o patógenos y que enmascare los resultados del experimento. El cuarto del experimento debe estar iluminado y la distancia entre plantas debe estar acorde con su hábito de crecimiento, también el cuarto de inoculación debe de estar limpio (Michel et al. 2010).

Preparación del inoculo: Tomar un fragmento de micelio aislado, previamente seleccionado, incubar en medio de cultivo por 14 días. Inocular Erlenmeyers (250 ml de capacidad) que contienen 100 ml del medio de cultivo PDB con 5 ml de una suspensión micelial con una concentración en orden de 10^5 fragmentos de micelio ml⁻¹). Incubar los Erlenmeyers inoculados en un agitador orbital (Gerhardt) a 26°C y 120 rpm durante 14 días. Eliminar el medio de cultivo por decantación y coleccionar el micelio. Tomar 1 g de micelio y homogeneizarlo en un tubo de ensayo (FALCON® de 50 ml de capacidad) con 30 ml de agua desionizada estéril en un homogeneizador (Ultra-turrax T25) durante 1 minuto (Figura 1). Filtrar el homogeneizado micelial a través de un tamiz (40 µm). Determinar la concentración de fragmentos de micelio ml⁻¹ mediante conteo en cámara de Neubauer en un microscopio óptico (aumento 100x). Ajustar con agua destilada estéril la concentración de fragmentos de micelio a un valor aproximado de 105 fragmentos de micelio ml⁻¹. Añadir gelatina para una concentración final del 1% (m/v) (Michel et al., 2010, pp 4-5).

inoculación y evaluación: Aplicar el homogeneizado micelial con un pincel sobre el envés de las tres hojas más jóvenes totalmente extendidas. Dejar secar las hojas inoculadas durante dos horas y luego mantenerla humedad relativa entre el 90-100% (mediante aspersión o nebulización) durante los tres primeros días y después se mantendrá por encima del 70%. Incluir como controles: plantas inoculadas con agua desionizada estéril (controles de inoculación), plantas inoculadas con gelatina al 1% (control de posible fitotoxicidad del adherente foliar), así como plantas sin inocular (controles absolutos). Revisar diariamente las plantas hasta que aparezcan macroscópicamente los primeros síntomas por el envés (aproximadamente a partir de los 10-14 días) (Michel et al., 2010, pp 5-6).

Escala de evolución de los síntomas de Sigatoka negra. Anexo N° 1

Estadio 1: Inicia los síntomas en el envés de la hoja es visible una pequeña mancha blancuzca o amarilla de 0,25 mm de diámetro.

Estadio 2: Las pizcas se agrandan y son visible tanto en el envés como en el haz, estas son de color café de un tamaño de 1 mm de ancho y 2 mm de largo, paralelas a las venas de las hojas.

Estadio 3: Las estrías o rayas son más grandes, alcanzando una longitud de 2 a 3 cm y de 2 mm de ancho

Estadio 4: Una mancha oval en el haz de la hoja, apreciada a simple vista.

Estadio 5: Una mancha elíptica que se vuelve totalmente negra visible en el haz y en el envés de la hoja. Esta mancha tiene un halo amarillo que la rodea y el centro comienza a deprimirse.

Estadio 6: El centro de la mancha se seca, adquiere un color blanco grisáceo lo rodea un anillo bien definido de color negro, rodeado a su vez por un halo de color amarillo brillante (Cedeño et al. 2017).

Escala evolutiva para la evaluación del desarrollo de los síntomas en hojas de *Musa spp.* Inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*, según (Alvarado-Capó et al, 2003 citado por Michel et al., 2010). (ANEXO N° 2)

1.3 Marco legal

Fundamentación Legal

Esta investigación está enmarcada en las Leyes y políticas que rigen el Ecuador.

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).

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 Régimen de la Soberanía Alimentaria, 2009).

CAPITULO 2

ASPECTOS METODOLÓGICOS

2.1 Métodos

Método inductivo: Se observó la información obtenida, se estableció patrones a partir de comparaciones de los datos y se concluirá de forma general.

Método deductivo: Permitió concluir de forma lógica lo observado en la aplicación de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. en el control de Sigatoka negra.

Método analítico: Estuvo basado en hechos comprobables recolectados en los datos obtenidos en el control de sigatoka usando *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.

Método sintético: Se concluyó y recomendó basados en conocimiento y metodología usados en la presente investigación.

2.1.1 Modalidad y tipo de investigación

Se la realizó de forma experimental en condiciones controladas y semicontroladas, tomando datos de la infección y severidad de la enfermedad de la Sigatoka negra a la aplicación de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., en los tratamientos planteados en esta investigación de manera cuantitativa y cualitativa en el diseño experimental usados para evaluar la eficacia en el control de Sigatoka negra en el cultivo de banano.

2.2 Variables

2.2.1 Variable independiente:

Dosis de *Trichoderma* spp, *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp. para el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en el cultivo de banano.

2.2.2 Variables dependientes:

2.2.2.1 Condiciones controladas

Prueba de antagonismo, los ensayos se realizaron en cajas Petri con PDA colocando un disco de 5 mm de diámetro de los antagonistas en un extremo de la caja Petri y al lado contrario el hongo patógeno (cultivo dual), luego se tomó el

crecimiento radial de los hongos y se valoró en porcentaje. Se la realizó con la fórmula usada por (Ezziyani et al. 2004).

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Donde:

R1 : Radio del fitopatógeno

R2 : Radio de fitopatógeno en prueba antagonista.

Tiempo que transcurre crecimiento de microorganismos, para inhibir el crecimiento del hongo.

2.2.2.2 Condiciones semi controladas

Tiempo de evolución de los síntomas. Se observó diariamente de forma visual, la aparición de los síntomas desde los 12 días después de la inoculación durante 30 días.

Índice de infección. Se lo realizó en porcentaje de área de la hoja lesionada, desarrollada por Stover (1971) y modificada por Gauhl (1994). Citado por (Marín 2018)

Evaluación de severidad: Se la calculó según la escala desarrollada por Stover (1971) y modificada por Gauhl (1994), citado por (Marín, 2018). Anexo, figura 1.

Frecuencia de muestreo: Se lo realizó cada semana por 4 semanas después de haber aplicado los microorganismos.

Emisión foliar: Se contó el número de hojas nuevas cada semana por cinco semanas después de iniciado la inoculación de las plántulas.

2.2.3 Operacionalización de Variables

Cuadro N° 1. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

| | TIPO DE VARIABLE | DEFINICION OPERACIONAL | DIMENSIONES | INDICADORES | TIPO DE MEDICIÓN | INSTRUMENTO DE MEDICIÓN |
|----------------------|--|--|--|--|------------------|---|
| INDEPENDIENTE | Aplicación de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp., para el control de sigatoka negra en el cultivo de banano | Evaluación en laboratorio y campo de <i>Mycospharella fijensis</i> Morelet | Dosis de <i>Trichoderma</i> spp. y confrontacion con <i>mycosphaerella fijensis</i> en cajas petri | Porcentaje inhibitorio de <i>Mycospharella fijensis</i> Morelet | Cuantitativa | La concentración de los microorganismos se ajustará a 1×10^7 en <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Bacillus</i> spp. |
| DEPENDIENTE | Condiciones controladas: Prueba de antagonismo. Tiempo de crecimiento de microorganismos. Condiciones semi controladas Prueba de antagonismo, porcentaje de infección, evaluación de severidad, frecuencia de muestreo, emisión foliar | | Crecimiento micelial de los hongos en mm | Porcentaje de infección del hongo sigatoka negra Índice de infección y severidad. | Cuantitativa | Registro de laboratorio y escala de severidad en campo |

2.3 Población y muestra

2.3.1 Población condiciones controladas. Estuvo conformada por 24 cajas Petri, con 3 tratamientos y 8 repeticiones (cajas Petri).

2.3.2. Población condiciones semicontroladas. Estuvo conformada por 32 plántulas, con 4 tratamiento y 4 repeticiones, duplicado.

2.3.3 Muestra. Cada caja Petri y planta fue considerada una unidad experimental.

2.4 Técnica de recolección de datos

Se observaron y tomaron los datos, en condiciones controladas y semi controladas, con equipos y herramientas, para evaluar la eficiencia de los biocontroladores como antagonistas de sigatoka negra.

2.4.1 Métodos y técnicas

Se intentó el aislamiento el aislamiento de *Mycospharella fijiensis* con la metodología de Michel et al., (2010), donde se recogieron hojas enfermas con síntomas avanzados, se incubaran las hojas en cámara húmeda a 26 °C, por 72 horas en lugar oscuro, luego se cortaran las hojas en discos de 5mm, y se colocará en cajas Petri con PDA, pasada las 72 horas se verificó que el crecimiento micelial se haya dado, se procedió a inocular en cajas petri. Sin embargo, la cepa de Sigatoka negra se compró al laboratorio CEBIOCA.

En cuanto al *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp., se compró en mercado local, verificando su ficha técnica respectiva y se procedió a sembrar en cajas Petri con medio de cultivos de PDA, donde se preservará para mantener el inóculo activo.

2.4.1.2 Pruebas de antagonismo *in vitro* en condiciones semicontroladas

Los aislados fueron sembrados en cajas petri con PDA para su desarrollo a 1 cm del borde se procedió a colocar un disco de 5 mm de diámetro de los antagonistas y al lado contrario el hongo patógeno (cultivo dual), luego se tomó el crecimiento radial de los hongos y se valoró en porcentaje.

La cepa de *P. fijiensis* se adquirió en Cebioca (Anexo N° 6) no se logró reproducir en laboratorio, una de las causales puede ser que las muestras de hojas fueron tomadas de fincas que están en proceso de cultivos comercial, con fumigación periódica de fungicidas sintéticos.

2.4.1.3 Inoculación y evaluación

Se inoculó las plantas de banano con *Mycosphaerella fijiensis*, la caja Petri que contiene el hongo patógeno se disolvió en 300ml de agua desionizada se agitó y se homogenizó los micelios se contó las esporas en la cámara de Neubauer 1×10^5 , luego se procedió con un atomizador la aplicación en el envés (Anexo N° 5) de la hoja extendida. Se deja secar las hojas por 2 horas y luego se mantiene la humedad relativa sobre 90% mediante bolsas plásticas, durante 72 horas. (Anexo N° 5)

A partir de los 12 días aparecieron los primeros síntomas de la enfermedad.

2.5 Estadística descriptiva e inferencial

El análisis de datos se llevó a cabo mediante la transformación de datos utilizando raíz cuadrada, y bajo el cumplimiento de los requerimientos paramétricos se procedió a realizar el análisis de varianza de los datos con la separación de medias de Tukey al 5% de error en el software Infostat 2020.

2. 6 Diseño experimental

Ensayo in vitro. Se utilizo un diseño completo al azar (DCA) utilizando tres tratamientos y ocho repeticiones, la unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri (Tabla 3).

Tabla N° 3. Esquema andeva condiciones controladas.

| Fuente de variación | Fórmula | Grados de libertad |
|---------------------|------------------------|--------------------|
| Tratamientos | $(t - 1) (3 - 1)$ | 2 |
| Error experimental | $t^*(r - 1) 3(8 - 1)$ | 21 |
| Total | $(t^*r - 1) (3*8 - 1)$ | 23 |

Elaborado por Valdez, 2024

Ensayo in vivo. Se utilizó el tratamiento de los datos recolectados para verificar la normalidad de los datos tanto en el Diseño Cuadrado Latino (DCL)

con dos replica, los cuales estuvieron conformados por cuatro tratamientos y cuatro repeticiones, una planta conformo la unidad experimental.

Tabla N° 4. Esquema andeva condiciones semi controladas.

| Fuente de variación | Fórmula | Grados de libertad |
|---------------------|-------------------|--------------------|
| Fila | $p-1$ | 3 |
| Columna | $p-1$ | 3 |
| Tratamientos | $(p - 1)$ | 3 |
| Replica | $r-1$ | 1 |
| Error experimental | $[r(p+1)-3](p-1)$ | 21 |
| Total | $r \cdot P^2 - 1$ | 31 |

Elaborado por Valdez, 2024

2.6.1 Tratamientos

Se realizaron 3 tratamientos y 8 repeticiones, en laboratorio con cajas Petri, en pruebas de antagonismo y en condiciones semi controladas con plántulas de banano, la cual fue inoculado con sigatoka negra y los microorganismos antagónicos.

Tabla N° 5. Tratamientos para el enfrentamiento dual de *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y *P. fijiensis*

| Tratamientos | Descripción | Longitud del disco | Aplicación |
|--------------|------------------------|--------------------|----------------------|
| T1 | <i>Trichoderma</i> spp | Disco 0.5 cm | Medio de cultivo PDA |
| T2 | <i>Bacillus</i> spp. | Disco 0.5 cm | |
| T3 | Testigo absoluto | Sin aplicación | |

Elaborado por: Valdez, 2024

La concentración de los microorganismos usada fue de 1×10^8 en *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp (Becker et al. 2021)

Para la fase experimental en condiciones de semicontroladas, los tratamientos para la evaluación de los microorganismos antagónicos *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp sobre el desarrollo de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet) en el cultivo de banano, se realizaron aplicaciones de forma individual de los microorganismos antagónicos, en

combinación entre ellos y un testigo absoluto, tal como se describe en la siguiente Tabla.

Tabla N°6. Tratamientos para usar en condiciones semicontroladas (plántulas de banano)

| Tratamientos | Descripción | Dosis | Aplicación |
|---------------------|---|-----------------|---------------------|
| T1 | <i>Trichoderma</i> spp | 5 ml/L | Plántulas de banano |
| T2 | <i>Trichoderma</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp. | 5 ml/L + 5 ml/L | |
| T3 | <i>Bacillus</i> spp. | 10 ml/L | |
| T4 | Testigo absoluto | Sin aplicación | |

Elaborado por: Valdez, 2024

3. RESULTADOS

Evaluaciones del efecto antagónico *in vitro* de sigatoka negra frente a *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp., en condiciones semi controladas.

En el tratamiento 1 los aislados fueron sembrados en cajas Petri con PDA más Jugo V8, para su desarrollo a 1 cm del borde se procedió a colocar un disco de 5 mL de diámetro de *Mycosphaerella fijiensis* y al lado contrario el hongo antagonista *Trichoderma* spp + aceite vegetal 5 mm (cultivo dual), luego se tomó el crecimiento radial de los hongos y se valoró en porcentaje. El tratamiento 2 se realizó de la misma forma, pero usando *Bacillus* spp 5 mL (cultivo dual). El tratamiento 3 fue el testigo donde se midió el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*.

Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) de *Mychosphaerells fijiensis*

En cuanto al porcentaje de inhibición de sigatoka negra en confrontamiento con el hongo antagonista *Bacillus* spp en prueba dual fue de 33,75% (Apéndice No 1), mientras que la inhibición de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo del fitopatógeno del banano *Mycosphaerella fijiensis* en prueba dual fue de 11,67%, con diferencia significativa ($p < 0,01$) cuando comparado con el crecimiento radial del testigo. En base a estos hallazgos, *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp inhiben moderadamente el crecimiento de sigatoka negra (*M. fijiensis*); aunque es importante resaltar que *Bacillus* spp, mostró mayor antagonismo que *Trichoderma* spp (Tabla N°7).

Tabla N°7. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) de *Mychosphaerells fijiensis*

| N° Tratamientos | Grupos | n | Crecimiento (mm) | *PICR% |
|-----------------------|-------------------------------------|---|---------------------|---------|
| 1 | <i>Bacillus</i> spp vs Sigatoka | 8 | 7,84 | 33,75 |
| 2 | <i>Trichoderma</i> spp. vs Sigatoka | 8 | 10,45 | 11,67 |
| Significancia p valor | | | <0,0001 | <0,0001 |

El $p < 0.01$ señala diferencia altamente significativa entre grupos, según prueba T para muestras independientes suponiendo varianzas iguales ($p > 0.05$).

*Porcentaje de Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial

Eficiencia de la aplicación de *Trichoderma* spp y *Bacillus* spp en el índice de infección y severidad de sigatoka negra en condiciones semicontroladas

Los resultados obtenidos demuestran que no hay diferencias estadísticas entre los tratamientos, sin embargo, mayor severidad se presentó en el testigo absoluto. Los tratamientos evaluados en plantas de banano con la aplicación de los hongos antagonistas mostraron menor severidad en comparación al testigo, teniendo al T3 (*Bacillus* spp) con un valor 14.24%, seguido del T1 (*Trichoderma* spp) con una severidad de 15.97%, el T2 (*Trichoderma* spp+*Bacillus* spp) con un porcentaje de 17.36% en la severidad y el mayor porcentaje de severidad se presentó en el testigo con un valor de 22.57% (Tabla N° 8).

Tabla N° 8. Índice de infección y severidad de sigatoka negra

| # Trat. | Descripción | PPI Media | Severidad % Media |
|----------------------------|---|--------------|----------------------|
| 3 | <i>Bacillus</i> spp | 0.88 a | 14.24 a |
| 1 | <i>Trichoderma</i> spp | 1.00 a | 15.97 a |
| 2 | <i>Trichoderma</i> spp+ <i>Bacillus</i> spp | 1.03 a | 17.36 a |
| 4 | Test. Abs. | 1.35 a | 22.57 a |
| Significancia tratamientos | | 0.2363 | 0.1878 |
| Replica | | 0.5434 | 0.6144 |
| Significancia filas | | 0.6622 | 0.6226 |
| Significancia columnas | | 0.2272 | 0.2932 |
| Coef. variación % | | 19.1 | 25.85 |

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$)

Desarrollo vegetativo a la aplicación de microorganismos en los diversos tratamientos de estudio.

Emisión foliar

El número de hojas fue dependiente del tratamiento aplicado en las plantas de banano, ya que la aplicación de *Trichoderma*+*Bacillus* y *Bacillus* spp muestran mayor cantidad ($p < 0.01$) de hojas seguido del tratamiento a base de *Trichoderma* spp. Se podría atribuir que los efectos bioestimulantes en la emisión de hojas se debe al uso de los mencionados antagonistas (Tabla N° 9). Lo mejores resultados se mostraron en el T2 (*Trichoderma* spp + *Bacillus* spp) con un valor de 7.75 hojas, seguido del tratamiento T3 (*Bacillus* spp) con una media de 7.5 hojas, el T1 (*Trichoderma* spp) con una media en la emisión de hojas de

7.13, teniendo al T4 (Testigo) con la media mas baja en el número de hojas emitidos con 6.5 (Tabla N° 9).

Tabla N° 9. Número de hojas en la semana 5

| # Trat. | Descripción | hojas |
|----------------------------|--|---------|
| 2 | <i>Trichoderma</i> spp + <i>bacillus</i> spp | 7.75 a |
| 3 | <i>Bacillus</i> spp | 7.5 a |
| 1 | <i>Trichoderma</i> spp | 7.13 ab |
| 4 | Test. Abs. | 6.5 b |
| Significancia tratamientos | | 0.0003 |
| Replica | | 0.7248 |
| Significancia filas | | 0.5046 |
| Significancia columnas | | 0.5046 |
| Coef. variación % | | 6.86 |

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$)

DISCUSIÓN

Los microorganismos antagonistas inhiben el desarrollo de fitopatógenos, en el presente estudio se realizó pruebas duales para conocer el antagonismo de los hongos *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp., sobre el fitopatógeno del banano *Mycosphaerella fijiensis*. Los resultados mostraron que al competir en el medio de desarrollo (PDA) bajo condiciones controladas la bacteria antagonista *Bacillus* spp. inhibió en un 33.75% en el desarrollo del fitopatógeno sigatoka negra, de acuerdo con la prueba Dual en comparación al crecimiento radial del fitopatógeno en el tratamiento testigo. Estos resultados concuerdan con la investigación realizada por Venkataramanamma et al., (2022) donde un aislado de *Bacillus* sp. exhibió porcentaje de inhibición de 74,36% sobre el control del fitopatógenos del banano *Fusarium oxysporum* f.sp.ciceris.

Los resultados en el análisis de la prueba dual con el hongo *Trichoderma* spp. mostró una reducción en el crecimiento micelial del fitopatógeno sigatoka negra en un 11.67%. En trabajo realizado por Yassin et al., (2022) se analizó la acción antagónica de *Trichoderma viride* y *T. harzianum* sobre el fitopatógeno *Alternaria alternata*, mostrando para el primer caso una inhibición de 75,04% y para el segunda prueba dual 65,83%. De igual manera en trabajo realizado por Chauiyakh et al. (2024) se evaluó la capacidad inhibidora de *Trichoderma* spp., mostrando gran capacidad de inhibir el crecimiento radial de patógenos en el medio de cultivo con porcentajes de colonización de 81,21%.

En cuanto a la severidad, en el presente trabajo los tratamientos evaluados en plantas de banano indican severidad baja cuando se aplicó los hongos antagonistas con valores que oscilaron entre 14.24 a 17.36% y en el testigo la severidad fue del 22.57%. *Bacillus* spp registró menor grado de severidad 14.24% seguido de la severidad presentada por el tratamiento con *Trichoderma* spp. en un 15.97% de severidad. Estos resultados tienen relación a los presentados por Castillo-Arévalo (2022), donde un bioformulado a base de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp., para el control de sigatoka negra en el cultivo de plátano (*Musa paradisiaca* L.) presentó un 36% de severidad sin diferencias significativas entre control químico y biológico. Así mismo Andrade-Hoyos et al. (2023) concluye que *Trichoderma* spp., es una alternativa para el

manejo fitosanitario en cultivos y amigable con ambiente. En trabajo realizado por Guzmán-Guzmán et al. (2024); Poveda y Eugui (2022b), determinan que la combinación de hongos del género *Trichoderma* con bacterias beneficiosas desencadenan un efecto sinérgicos de ambos microorganismos formando una biopelícula, la cual es un aspecto clave para control de enfermedades y promotor de crecimiento de las plantas.

Los resultados en el desarrollo vegetativo del cultivo de banano con la aplicación de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. en condiciones semicontroladas, muestran mayor cantidad de hojas se presentó en el tratamiento con la combinación de bacteria y hongos antagonistas *Trichoderma* spp. + *Bacillus* spp., con una media de 7.75 hojas, seguido del tratamiento con *Bacillus* spp., con 7.5 hojas, siendo la estimulación de los microorganismos mayor en la emisión foliar cuando comparado con el testigo que presentó un número de 6.5 hojas emitidas. En trabajo realizado por Samuelian (2016), se mostró que dentro de los atributos que posee *Trichoderma* spp., como de biocontrol de enfermedades, mejorar la salud de los suelos, también promueve el desarrollo de las plantas. Para Moreira, Cairo, Borges, L. D. da Silva, et al. (2021) y Prasad et al. (2023), la aplicación de sustratos inoculados con *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp., solos o juntos contribuyen al incremento y asimilación en el contenido de fósforo y potasio en las raíces, mostrando un potencial para promover el crecimiento de las plántulas de banano.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluye que el uso de los hongos antagonistas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. mostraron tener un efecto inhibitor sobre el desarrollo del fitopatógeno del banano *Mycosphaerella fijiensis*, esto con la aplicación de forma individual de cada hongo antagonistas o en la aplicación en conjunto.

Los microorganismos antagonistas *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. mostraron resultados positivos en cuanto a la manifestación en la severidad del fitopatógeno de la sigatoka negra y se evidenció un estímulo en el desarrollo en el cultivo de banano en cuanto a la producción del área foliar, mostrando un incremento mayor en el número de hojas cuando se aplicaron los microorganismos de forma combinada.

El uso de microorganismos antagonistas de enfermedades es una alternativa válida para bajar la carga química y formar parte de un programa fitosanitario donde se lo rotaría con los pesticidas convencionales que en la actualidad usan los productores bananeros.

RECOMENDACIONES

En base a la presente investigación, se recomienda realizar ensayos a nivel comercial en plantaciones de banano establecidas, aplicados en conjunto *Trichoderma* spp., más *Bacillus* spp., de forma individual en el follaje y de forma edáfica en el cultivo de banano.

Se sugiere realizar ensayos *in vitro* de sensibilidad fungicida, ya que el lento crecimiento de *Sigatoka* impide estimar el mejor antagonista bajo dichas condiciones.

Es necesario investigar los diversos mecanismos de acción, asociado a los microorganismos antagónicos *Trichoderma* spp., y *Bacillus* spp., para el control de fitopatógenos y como promotor o estimulante en el desarrollo morfológico de las plantas.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alcivar, Francisco Javier Arteaga. 2015. «origen y evolución del banano».
- Andrade-Hoyos, Petra, Mally N. Rivera-Jiménez, Nadia Landero-Valenzuela, Hilda V. Silva-Rojas, Saira J. Martínez-Salgado, y Omar Romero-Arenas. 2023. «Beneficios ecológicos y biológicos del hongo cosmopolita *Trichoderma* spp. en la agricultura: una perspectiva en el campo mexicano». *Revista Argentina de Microbiología* 55(4):366-77. doi: 10.1016/j.ram.2023.06.005.
- Anón. 2023. «Musa x paradisiaca (MUBPA)[Overview]] EPPO Global Database». Recuperado 19 de junio de 2023 (<https://gd.eppo.int/taxon/MUBPA>).
- Anón. s. f. «Pseudocercospora fijiensis (MYCOFI)[Overview]] EPPO Global Database». Recuperado 18 de junio de 2023 (<https://gd.eppo.int/taxon/MYCOFI>).
- Arif, Samiah, Muhammad Farooq Hussain Munis, Fiza Liaquat, Shazma Gulzar, Urooj Haroon, Lina Zhao, y Yidong Zhang. 2023. «Trichoderma Viride Establishes Biodefense against Clubroot (Plasmodiophora Brassicae) and Fosters Plant Growth via Colonizing Root Hairs in Pak Choi (Brassica Campestris Spp. Chinesnsis)». *Biological Control* 183:105265. doi: 10.1016/j.biocontrol.2023.105265.
- Awad, Nagwa E., Hanaa A. Kassem, Manal A. Hamed, Amal M. El-Feky, Mohamed A. A. Elnaggar, Khaled Mahmoud, y Mohamed A. Ali. 2018. «Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*». *Mycology* 9(1):70-80. doi: 10.1080/21501203.2017.1423126.
- Azeem, Saba, Syed Inayatullah Agha, Neelam Jamil, Bushra Tabassum, Shan Ahmed, Asif Raheem, Nusrat Jahan, Niaz Ali, y Anwar Khan. 2022. «Characterization and Survival of Broad-Spectrum Biocontrol Agents against Phytopathogenic Fungi». *Revista Argentina de Microbiología* 54(3):233-42. doi: 10.1016/j.ram.2021.10.005.
- Bebber, Daniel P. 2019. «Climate change effects on Black Sigatoka disease of banana». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374(1775):20180269. doi: 10.1098/rstb.2018.0269.
- Becker, Patrick, Paul Esker, y Gerardina Umaña. 2021. «Incorporation of Microorganisms to Reduce Chemical Fungicide Usage in Black Sigatoka Control Programs in Costa Rica by Use of Biological Fungicides». *Crop Protection* 146:105657. doi: 10.1016/j.cropro.2021.105657.
- Blake, Christopher, Mathilde Nordgaard Christensen, y Akos T. Kovacs. 2020. «Aspectos moleculares de la promoción y protección del crecimiento vegetal por *Bacillus subtilis*». Recuperado 21 de junio de 2023 (<https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>).

- Castillo-Arévalo, Trinidad. 2022. «Estrategias biológicas para el manejo de la sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* M.) en cultivo de plátano (*Musa paradisiaca* L.) AAB en Rivas, Nicaragua». *Revista Colegiada de Ciencia* 4(1):106-15.
- Castro, Rosa, Marcia Pesántez, Pedro Lema, José Quevedo, Pablo Arichabala, y Yelenys Alvarado-Capó. 2015. «Potential Use of *Trichoderma* -Based Bioproduct for Black Leaf Streak Disease (*Mycosphaerella Fijiensis*) Management in the Field». *Biocontrol Science and Technology* 25(4):481-86. doi: 10.1080/09583157.2014.982512.
- Cavero, Poholl Adan Sagratzki, Rogério Eiji Hanada, Luadir Gasparotto, Rosalee Albuquerque Coelho Neto, y Jorge Teodoro De Souza. 2015. «Biological Control of Banana Black Sigatoka Disease with *Trichoderma*». *Ciência Rural* 45(6):951-57. doi: 10.1590/0103-8478cr20140436.
- Cedeño, Galo, Carmen Suarez, Danilo Vera, Carlo Fadda, y Devra Jarvis. 2017. «Early detection of resistance to *Mycosphaerella fijiensis* in local genotypes of *Musa* in Ecuador». *Scientia Agropecuaria* 8:29-42. doi: 10.17268/sci.agropecu.2017.01.03.
- Chauiyakh, Oussama, Elmostafa El Fahime, Samar Aarabi, Oumaima Ninich, Safae El Aammouri, Samir Bikri, Abdelaziz Chaouch, y Aziz Ettahir. 2024. «In vitro antagonist activity of cedar *Trichoderma* species against three cedarwood lignivorous fungi». *Scientific African* 24:e02174. doi: 10.1016/j.sciaf.2024.e02174.
- Contreras-Cornejo, Hexon Angel, Lourdes Macías-Rodríguez, Jesús Salvador López-Bucio, y José López-Bucio. 2014. «Chapter 36 - Enhanced Plant Immunity Using *Trichoderma*». Pp. 495-504 en *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, editado por V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina, y M. G. Tuohy. Amsterdam: Elsevier.
- Cortes, Marcio Vinicius de Carvalho Barros, Elder Tadeu Barbosa, Maythsulene Inacio de Sousa Oliveira, Liriel Helen Rodrigues Maciel, Murillo Lobo Junior, Fabiano Jares Contesini, Marta Cristina Corsi de Filippi, y Valacia Lemes da Silva-Lobo. 2023. «*Trichoderma Harzianum* Marker-Free Strain Construction Based on Efficient CRISPR/Cas9 Recyclable System: A Helpful Tool for the Study of Biological Control Agents». *Biological Control* 184:105281. doi: 10.1016/j.biocontrol.2023.105281.
- Cuellar-Gaviria, Tatiana Z., Lina M. González-Jaramillo, y Valeska Villegas-Escobar. 2021. «Role of *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 cells and lipopeptides in the biological control of black Sigatoka disease». *Biological Control* 155:104523. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104523.
- Etebu, Ebimiewei, y Wabiye Young-Harry. 2011. «Control of Black Sigatoka Disease: Challenges and Prospects».
- Ezziyyani, Mohammed, Consuelo Pérez Sánchez, María Emilia Requena, Ahmed Sid Ahmed, y María Emilia Candela Castillo. 2004. «Evaluación

del biocontrol de *Phytophthora Capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*». *Anales de Biología* (26):47-59.

FAO. 2020. «Perspectivas a mediano plazo: perspectivas para la producción y el comercio mundial de bananos y frutas tropicales 2019-2028».

FAO. s.f. «La Sigatoka Negra, una enfermedad a ser combatida en las plantaciones bananeras».

Ferreira, Flavia V., y Matías A. Musumeci. 2021. «Trichoderma as Biological Control Agent: Scope and Prospects to Improve Efficacy». *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 37(5):90. doi: 10.1007/s11274-021-03058-7.

Fiorentino, Nunzio, Valeria Ventorino, Sheridan L. Woo, Olimpia Pepe, Armando De Rosa, Laura Gioia, Ida Romano, Nadia Lombardi, Mauro Napolitano, Giuseppe Colla, y Youssef Rouphael. 2018. «Trichoderma-Based Biostimulants Modulate Rhizosphere Microbial Populations and Improve N Uptake Efficiency, Yield, and Nutritional Quality of Leafy Vegetables». *Frontiers in Plant Science* 9:743. doi: 10.3389/fpls.2018.00743.

Guerrero, José Quevedo. 2018. «Efecto del uso predominante de fungicidas sistémicos para el control de sigatoka negra (*mycosphaerella fijiensis* morelet) en el área foliar del banano». 6(1):128-36.

Gutierrez-Monsalve, Jaime A., Sandra Mosquera, Lina María González-Jaramillo, John J. Mira, y Valeska Villegas-Escobar. 2015. «Effective Control of Black Sigatoka Disease Using a Microbial Fungicide Based on *Bacillus Subtilis* EA-CB0015 Culture». *Biological Control* 87:39-46. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.04.012.

Guzmán-Guzmán, Paulina, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Pedro Damián Loeza-Lara, y Gustavo Santoyo. 2024. «Mecanismos sinérgicos entre las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas y *Trichoderma* para controlar las enfermedades de las plantas». Pp. 121-42 en *Biocontrol Agents for Improved Agriculture, Plant and Soil Microbiome*, editado por A. Kumar, G. Santoyo, y J. Singh. Academic Press.

Hernández-Melchor, Dulce Jazmín, Ronald Ferrera-Cerrato, Alejandro Alarcón, Dulce Jazmín Hernández-Melchor, Ronald Ferrera-Cerrato, y Alejandro Alarcón. 2019. «Trichoderma: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial». *Chilean journal of agricultural & animal sciences* 35(1):98-112. doi: 10.4067/S0719-38902019005000205.

Manoharachary, Chakravarthula, Harikesh Bahadur Singh, y Ajit Varma, eds. 2020. *Trichoderma: Agricultural Applications and Beyond*. Vol. 61. Cham: Springer International Publishing.

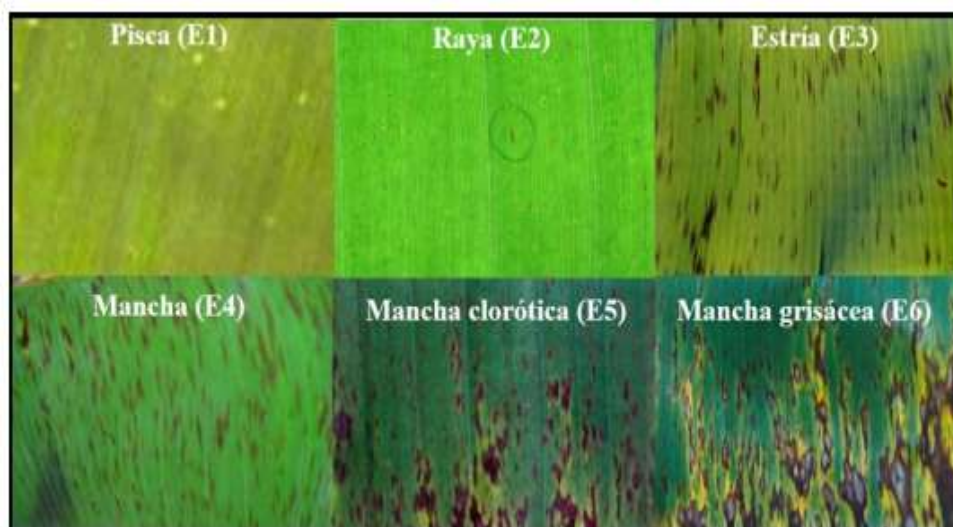
Marin, Douglas. 2018. «Instructivo para la evaluación de incidencia y severidad de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* MORELET)».

- Michel, Leiva Mora, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-suárez, Mileidy Cruz Martin, Cynthia Sánchez-García, Berkis Roque, y Autor Correspondencia. 2010. «Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia». 1609-1841.
- Moreira, Flávia Melo, Paulo Araquém Ramos Cairo, Ana Lúcia Borges, Leandro Dias da Silva, y Fernando Haddad. 2021. «Investigando la mezcla ideal de suelo y compuesto orgánico con *Bacillus* sp. e inoculaciones de *Trichoderma asperellum* para un crecimiento óptimo y contenido de nutrientes de plántulas de banano». *South African Journal of Botany* 137:249-56. doi: 10.1016/j.sajb.2020.10.021.
- Moreira, Flávia Melo, Paulo Araquém Ramos Cairo, Ana Lúcia Borges, Leandro Dias Da Silva, y Fernando Haddad. 2021. «Investigating the Ideal Mixture of Soil and Organic Compound with *Bacillus* Sp. and *Trichoderma Asperellum* Inoculations for Optimal Growth and Nutrient Content of Banana Seedlings». *South African Journal of Botany* 137:249-56. doi: 10.1016/j.sajb.2020.10.021.
- Muthukathan, Gopi, Poulomi Mukherjee, Darshana Salaskar, Shikha Pachauri, Himanshu Tak, Thumballi R. Ganapathi, y Prasun K. Mukherjee. 2020. «Secretome of *Trichoderma Virens* Induced by Banana Roots - Identification of Novel Fungal Proteins for Enhancing Plant Defence». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 110:101476. doi: 10.1016/j.pmpp.2020.101476.
- Orozco-Santos, Mario, José Orozco-Romero, Octavio Pérez-Zamora, Gilberto Manzo-Sánchez, Javier Farías-Larios, y Wilson Da Silva Moraes. 2008. «Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos». *Tropical Plant Pathology* 33(3). doi: 10.1590/S1982-56762008000300003.
- Pedro Arias, Cora Dankers, Pascal Liu, Paul Pilkauskas, y FAO. s. f. *La economía mundial del banano 1985-2002*. Recuperado 19 de junio de 2023 (<https://www.fao.org/3/y5102s/y5102s03.htm>).
- Poveda, Jorge, y Daniel Eugui. 2022a. «Combined Use of *Trichoderma* and Beneficial Bacteria (Mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of Microbial Synergistic Bio-Inoculants in Sustainable Agriculture». *Biological Control* 176:105100. doi: 10.1016/j.biocontrol.2022.105100.
- Poveda, Jorge, y Daniel Eugui. 2022b. «Uso combinado de *Trichoderma* y bacterias beneficiosas (principalmente *Bacillus* y *Pseudomonas*): Desarrollo de bioinoculantes microbianos sinérgicos en agricultura sostenible - ScienceDirect». Recuperado 15 de mayo de 2024 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964422002651>).
- Prasad, Bhairav, Deepak Sharma, Pankaj Kumar, y Ramesh Chandra Dubey. 2023. «Potencial de biocontrol de *Bacillus* spp. para sistemas agrícolas

- resilientes y sostenibles». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 128:102173. doi: 10.1016/j.pmpp.2023.102173.
- Samuelian, Suren. 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(1):8. doi: 10.1007/s13205-015-0327-0.
- Sharma, Anil K., y Pratibha Sharma, eds. 2020. *Trichoderma: Host Pathogen Interactions and Applications*. Singapore: Springer Singapore.
- Singh, Akanksha, Birinchi K. Sarma, Harikesh B. Singh, y R. S. Upadhyay. 2014. «Chapter 40 - *Trichoderma*: A Silent Worker of Plant Rhizosphere». Pp. 533-42 en *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, editado por V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina, y M. G. Tuohy. Amsterdam: Elsevier.
- Singh, Dhananjaya Pratap, Harikesh Bahadur Singh, y Ratna Prabha, eds. 2016. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. New Delhi: Springer India.
- SIPA. 2023a. «Boletín Situacional Banano 2021». Recuperado 28 de marzo de 2023 (<https://online.fliphtml5.com/ijia/nbkc/>).
- SIPA. 2023b. «Boletín Situacional Banano 2022». Recuperado 20 de junio de 2023 (<https://online.fliphtml5.com/ijia/cojm/>).
- Tyśkiewicz, Renata, Artur Nowak, Ewa Ozimek, y Jolanta Jaroszuk-Ściśeł. 2022. «*Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth». *International Journal of Molecular Sciences* 23(4):2329. doi: 10.3390/ijms23042329.
- Vargas, A., M. Araya, M. Guzmán, y G. Murillo. 2009. «Effect of Leaf Pruning at Flower Emergence of Banana Plants (*Musa AAA*) on Fruit Yield and Black Sigatoka (*Mycosphaerella Fijiensis*) Disease». *International Journal of Pest Management* 55(1):19-25. doi: 10.1080/09670870802450219.
- Vázquez-Euán, Roberto, Bartolomé Chi-Manzanero, Ioreni Hernández-Velázquez, Miguel Tzec-Simá, Ignacio Islas-Flores, Luciano Martínez-Bolaños, Eduardo R. Garrido-Ramírez, y Blondy Canto-Canché. 2019. «Identification of New Hosts of *Pseudocercospora Fijiensis* Suggests Innovative Pest Management Programs for Black Sigatoka Disease in Banana Plantations». *Agronomy* 9(10):666. doi: 10.3390/agronomy9100666.
- Venkataramanamma, K., B. V. Bhaskara Reddy, R. Sarada Jayalakshmi, V. Jayalakshmi, y L. Rajendran. 2022. «Isolation, in vitro evaluation of *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and their growth promotion activity». *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 32(1):123. doi: 10.1186/s41938-022-00618-3.

- Villarreal-Delgado, María Fernanda, Eber Daniel Villa-Rodríguez, Luis Alberto Cira-Chávez, María Isabel Estrada-Alvarado, Fannie Isela Parra-Cota, Sergio de los Santos-Villalobos, María Fernanda Villarreal-Delgado, Eber Daniel Villa-Rodríguez, Luis Alberto Cira-Chávez, María Isabel Estrada-Alvarado, Fannie Isela Parra-Cota, y Sergio de los Santos-Villalobos. 2018. «El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola». *Revista mexicana de fitopatología* 36(1):95-130. doi: 10.18781/r.mex.fit.1706-5.
- Wang, X. Q., D. L. Zhao, L. L. Shen, C. L. Jing, y C. S. Zhang. 2018. «Application and Mechanisms of *Bacillus Subtilis* in Biological Control of Plant Disease». Pp. 225-50 en *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 1: Stress Management and Agricultural Sustainability*, editado por V. S. Meena. Singapore: Springer.
- Yassin, Mohamed Taha, Ashraf Abdel-Fattah Mostafa, y Abdulaziz Abdulrahman Al-Askar. 2022. «In vitro antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against fungal pathogens causing black point disease of wheat». *Journal of Taibah University for Science* 16(1):57-65. doi: 10.1080/16583655.2022.2029327.

ANEXOS



ANEXO No 1. Escala de evolución de los síntomas de Sigatoka negra según fouré (1985) citado por (Cedeño et al. 2017).



Anexo No 2. Escala evolutiva para la evaluación del desarrollo de los síntomas en hojas de *Musa* spp. Inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*



ANEXO No 3. Recolección de hojas enfermas de Sigatoka negra.



ANEXO No 4. Inoculación de plantas de banano de 16 semanas 3 días antes de inoculación de Sigatoka negra, con *Trichoderma spp* y *Bacillus spp*.



ANEXO NO 5. Inoculación de Sigatoka negra a plantas de banano, en las 3 primeras hojas.



Anexo No 6. Cepa de *P. fijiensis*, conseguida en Cebioca.



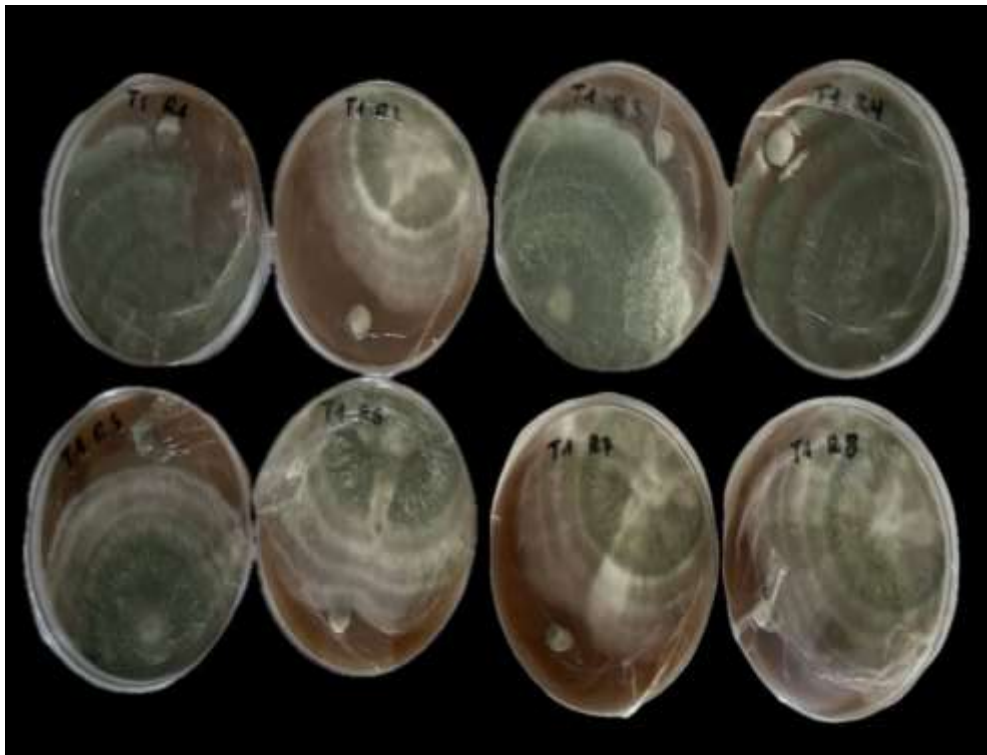
ANEXO No 7. Preparación de cajas Petri para pruebas dual.



Anexo No 8. Prueba dual Sigatoka negra vs *Bacillus* spp



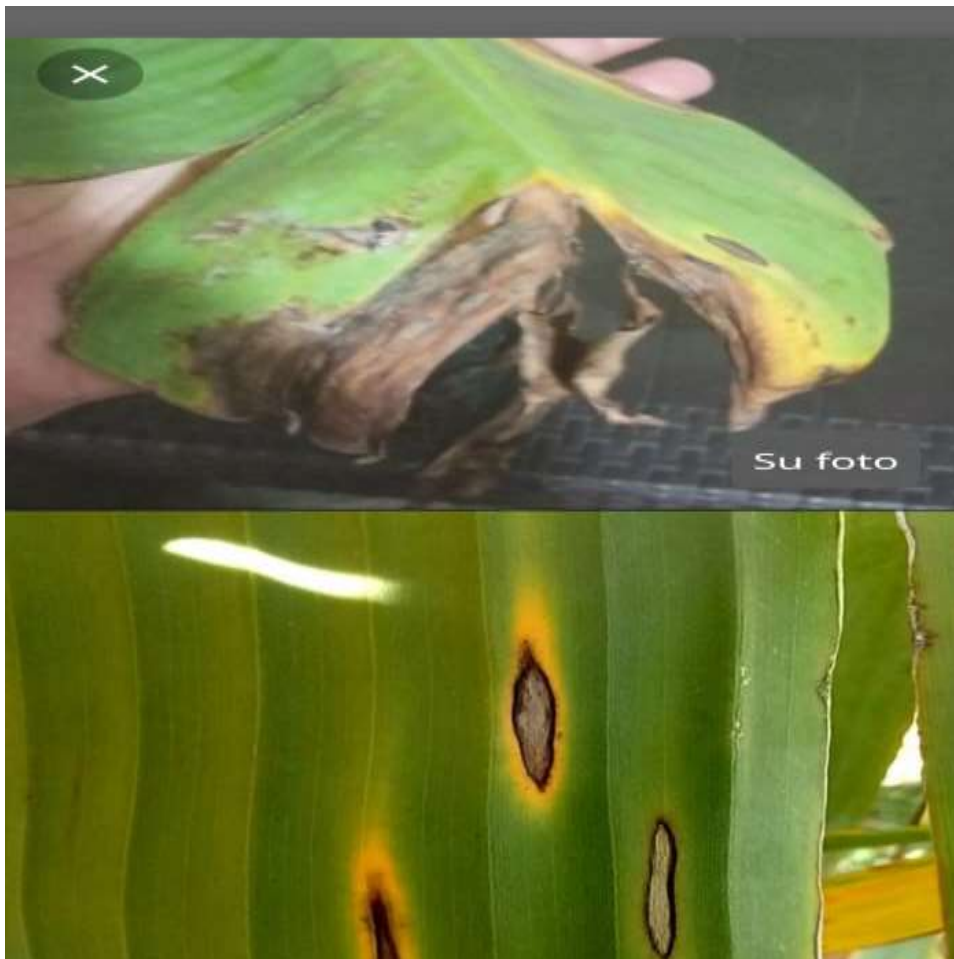
Anexo No 9. Tratamientos, prueba dual Sigatoka negra vs *Bacillus* spp, Sigatoka negra vs *Trichoderma* spp. Testigo absoluto (Sigatoka negra)



Anexo No 10. Prueba dual, *Trichoderma* spp vs *M. fijiensis* a los 8 dda



Anexo No 11. Plántulas de banano.



Anexo No 12. Evaluación de infección de sigatoka negra.



Anexo No 13. Evaluación de Infección de Sigatoka negra.

"LEA LA ETIQUETA ANTES DE USAR EL PRODUCTO"
"MANTÉNGALO BAJO LLAVE FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS"
"NO INGERIR"

BIOGENESIS: Es un bioproducto rico en microorganismos y sustancias bioactivas, que contiene altas concentraciones de microorganismos con la capacidad de multiplicar y colonizar la materia orgánica del suelo y ponerla a disposición de las plantas, así como de generar la estabilidad edáfica y foliar.

Contiene sustancias bioactivas y compuestos húmicos capaces de estimular el crecimiento vegetal.

Promueve la germinación, la ocreción, el desarrollo de los frutos y la reproducción de las plantas.

Incrementa la eficacia de la materia orgánica disponible en el suelo como fertilizante.

INSTRUCCIONES DE USO:

"CONSULTE CON UN TÉCNICO PROFESIONAL"

| USO TIPO | USOS | ÉPOCA DE APLICACIÓN | FORMA DE APLICACIÓN |
|------------------------|------|-----------------------|---------------------|
| Ornato (Noe 000000444) | 2/14 | Desarrollo vegetativo | Foliar, Edáfico |

La información presentada tiene carácter informativo, la cual puede variar de acuerdo con las condiciones fisiológicas de la planta y condiciones de clima.

INOCULANTE BIOLÓGICO

BIO GENESIS

APLICACIÓN FOLIAR Y EDÁFICO

COMPOSICIÓN Y CONCENTRACIÓN:

Bacillus sp. 4.6x10⁸ UFC

Aminoácidos totales 1.85 % p/v



Fabricante y Titular del Registro:
Sociedad Infa S.A.
Paseo Central de CVT, Base Central
Contacto: 022222222@gmail.com

"AGÍTESE ANTES DE USAR"

PRECAUCIONES: Durante la preparación y utilización del producto **NO COMER, BEBER o FUMAR**. Usar ropa protectora adecuada guantes, delantal, overol, botas, gafas, casco o gorra, mascarilla contra la niebla de suspensión, respirador, etc. "Conservar el producto lejos de las bebidas y los alimentos para las personas y los animales". "No permita animales en el área tratada". "No contamine fuentes de agua". "Conservar el producto en el envase original etiquetado y cerrado herméticamente". "No emplear este envase para ningún otro fin". "No re-empacar o depositar el contenido en otros envases". "Después de usar el contenido, inutilízalo triturando o perforándolo y deposítelo en un contenedor y entregue al distribuidor para la disposición final".

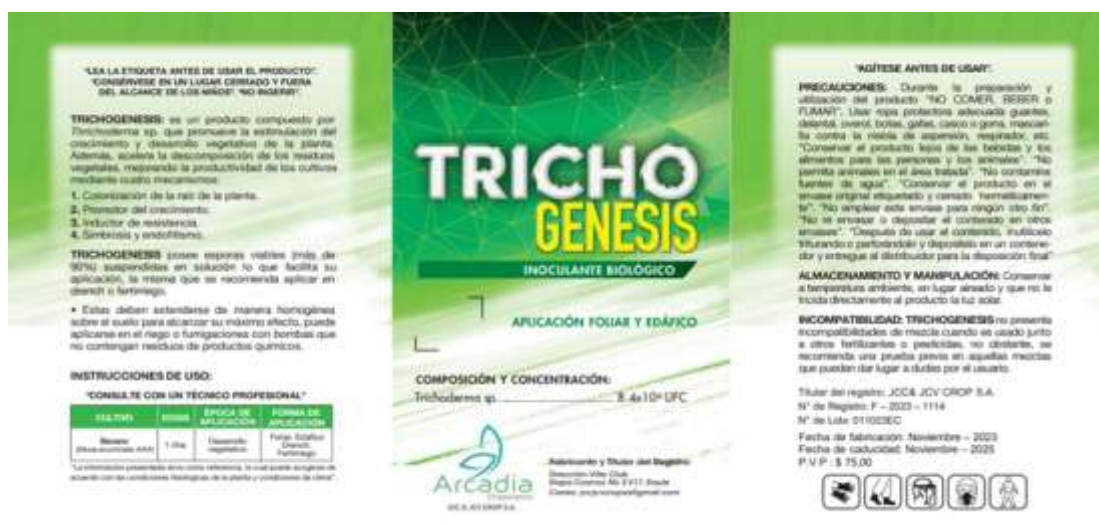
ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN: Conservar a temperatura ambiente, en lugar seco y que no le incida directamente el producto la luz solar.

INCOMPATIBILIDAD: BIOGENESIS no presenta incompatibilidades de mezcla cuando es usado junto a otros fertilizantes o pesticidas, no obstante, se recomienda una prueba previa en aquellas mezclas que puedan dar lugar a dudas por el usuario.

Título del registro: JCCA JCV CRDP S.A.
N° de Registro: F-2021-1111
N° de Lote: 011023EC
Fecha de fabricación: Noviembre - 2023
Fecha de caducidad: Noviembre - 2025
P.V.P. : \$ 18.00



Anexo No 14. Etiqueta *Bacillus* spp



Anexo No 15. Etiqueta *Trichoderma spp*

FICHA DE ENTREGA DE MICROORGANISMO

Microorganismo: *Pseudocercospora fijiensis* **Código cepario:** CCMCIBE- H629

Fecha de entrega del microorganismo: 27/02/2024

CATEGORÍA:

Patógeno: Endófito:

Hospedante:

DATOS DEL HOSPEDERO:

Cultivar: Banano Provincia: Guayas

Tejido vegetal: Hoja

CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO:

Medio de cultivo: PDA con antibiótico

Nivel de bioseguridad: tipo I

Temperatura de incubación: 28°C

DATOS DE ENTREGA DEL MICROORGANISMOS:

Número de cajas/tubos: 1 caja petri

Fecha de siembra: 08-02-2024

Medio de cultivo: PDA con antibiótico

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN:

Medio para conservación: PDB+ glicerol 20%

Temperatura: -80°C Fecha de obtención: 2019

TIPOS DE IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO:

Molecular: Región secuenciada: ITS

Porcentaje de identidad: 100%

Secuencia:

```

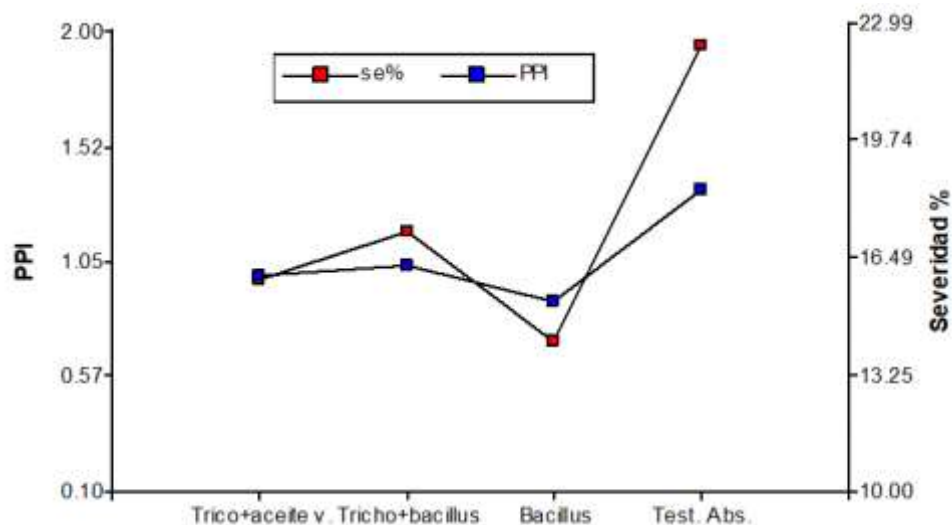
ACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGA
GTGAAGCGGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTAAGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGG
GGTAGCGGCCGGTCTAAGTTCTTGGAAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTACGCTGACTGGCTT
GCACCTCCACGTAGCTCTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGAGGTAATAATTT
CTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTT
TGGAAAGAGAGATTAAGAAAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGCCCGCAACAGACTTTGCGGGCGGTG
TTCCGCGGGTCTTCGACCGGTTTACTCGCCGCCGAGGAGCCATCATCGTCTGGGACCCGCTGGATAAGAC
CCGAGGAATGTAGCTCCCTTCGGGGTGTGTTATAGCCTCGGGTGATGCAGCGGTCCCGGGCGAGGTTCCG
CGTTCGGCAAGGATGATGGC
  
```

Anexo No 16. Ficha técnica de cepa de *P. fijiensis*.



Anexo N° 17. Seguimiento del tutor

Apéndice



Apéndice No 2. Porcentaje de infección y severidad externa de sigatoka negra de banano

PPIR

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| PPIR | 32 | 0.26 | 0.00 | 19.10 |

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo | 0.59 | 10 | 0.06 | 0.72 | 0.6983 |
| Descripcion | 0.24 | 3 | 0.08 | 0.99 | 0.4162 |
| Replica | 0.03 | 1 | 0.03 | 0.34 | 0.5688 |
| Fila>Replica | 0.16 | 3 | 0.05 | 0.65 | 0.5903 |
| Columna | 0.16 | 3 | 0.05 | 0.64 | 0.5968 |
| Error | 1.72 | 21 | 0.08 | | |
| Total | 2.31 | 31 | | | |

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0818 gl: 21

| Descripcion | Medias | n | E.E. |
|-----------------|--------|---|--------|
| Bacillus | 1.42 | 8 | 0.10 A |
| Tricho+bacillus | 1.45 | 8 | 0.10 A |
| Trico+aceite v. | 1.47 | 8 | 0.10 A |
| Test. Abs. | 1.64 | 8 | 0.10 A |

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

Apéndice No 3. Análisis de varianza para la variable Promedio Ponderado de Infección (PPI)

seR

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| seR | 32 | 0.26 | 0.00 | 25.85 |

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo | 9.95 | 10 | 0.99 | 0.72 | 0.6954 |
| Descripcion | 4.49 | 3 | 1.50 | 1.09 | 0.3761 |
| Replica | 0.32 | 1 | 0.32 | 0.23 | 0.6341 |
| Fila>Replica | 2.71 | 3 | 0.90 | 0.65 | 0.5888 |
| Columna | 2.43 | 3 | 0.81 | 0.59 | 0.6297 |
| Error | 28.91 | 21 | 1.38 | | |
| Total | 38.86 | 31 | | | |

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 1.3768 gl: 21

| Descripcion | Medias | n | E.E. |
|-----------------|--------|---|--------|
| Bacillus | 4.22 | 8 | 0.43 A |
| Trico+aceite v. | 4.37 | 8 | 0.43 A |
| Tricho+bacillus | 4.39 | 8 | 0.43 A |
| Test. Abs. | 5.18 | 8 | 0.43 A |

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

Apéndice No 4. Análisis de varianza para la variable severidad externa

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| Hojas | 32 | 0.62 | 0.43 | 6.86 |

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo | 8.31 | 10 | 0.83 | 3.39 | 0.0089 |
| Descripcion | 7.09 | 3 | 2.36 | 9.63 | 0.0003 |
| Replica | 0.03 | 1 | 0.03 | 0.13 | 0.7248 |
| Fila>Replica | 0.59 | 3 | 0.20 | 0.81 | 0.5046 |
| Columna | 0.59 | 3 | 0.20 | 0.81 | 0.5046 |
| Error | 5.16 | 21 | 0.25 | | |
| Total | 13.47 | 31 | | | |

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.69058

Error: 0.2455 gl: 21

| Descripcion | Medias | n | E.E. |
|-----------------|--------|---|----------|
| Test. Abs. | 6.50 | 8 | 0.18 A |
| Trico+aceite v. | 7.13 | 8 | 0.18 A B |
| Bacillus | 7.50 | 8 | 0.18 B |
| Tricho+bacillus | 7.75 | 8 | 0.18 B |

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

Apéndice No 5. Análisis de varianza para la variable número hojas

| | | COLUMNAS | | | |
|------|--|----------|------|------|------|
| FLAS | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | | T1R1 | T2R1 | T3R1 | T4R1 |
| 2 | | T3R2 | T1R2 | T4R2 | T2R2 |
| 3 | | T2R3 | T4R3 | T1R3 | T3R3 |
| 4 | | T4R4 | T3R4 | T2R4 | T1R4 |

REPLICA 2

| | | COLUMNAS | | | |
|------|--|----------|------|------|------|
| FLAS | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | | T1R1 | T2R1 | T3R1 | T4R1 |
| 2 | | T3R2 | T1R2 | T4R2 | T2R2 |
| 3 | | T2R3 | T4R3 | T1R3 | T3R3 |
| 4 | | T4R4 | T3R4 | T2R4 | T1R4 |

Apéndice No 6. Esquema del ensayo in vivo bajo un diseño Cuadrado Latino Replicado (DCLR).

| SIGATOKA + TRICHODERMA | | | SIGATOKA + BACILLUS SP | | | TESTIGO SIGATOKA | | |
|------------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|--------------|------------------|-------|------------|
| Tratamiento s | SIGATOK A | SIGATOK A | Tratamiento s | SIGATOK A | SIGATOK A | Tratamiento s | 1 DÍA | 12 DÍAS |
| | 1 DÍA | 10 DIAS | | 1 DÍA | 12 DIAS | | | |
| | mm | mm | | mm | mm | | mm | mm |
| T1 - R1 | 5 mm | 9.5 | T2 - R1 | 5 mm | 8.5 | T3 - R1 | 5 mm | 13.5 |
| T1 - R2 | 5 mm | 11.2 | T2 - R2 | 5 mm | 7 | T3 - R2 | 5 mm | 14 |
| T1 - R3 | 5 mm | 10.4 | T2 - R3 | 5 mm | 8.4 | T3 - R3 | 5 mm | 12 |
| T1 - R4 | 5 mm | 10.5 | T2 - R4 | 5 mm | 7.5 | T3 - R4 | 5 mm | 11.9 |
| T1 - R5 | 5 mm | 11 | T2 - R5 | 5 mm | 7 | T3 - R5 | 5 mm | 12 |
| T1 - R6 | 5 mm | 10 | T2 - R6 | 5 mm | 7.8 | T3 - R6 | 5 mm | 11.5 |
| T1 - R7 | 5 mm | 11.1 | T2 - R7 | 5 mm | 8.9 | T3 - R7 | 5 mm | 10.7 |
| T1 - R8 | 5 mm | 9.9 | T2 - R8 | 5 mm | 7.6 | T3 - R8 | 5 mm | 9 |

Apéndice No 7. Matriz de datos de la variable crecimiento radial *in vitro*.

| Replica | TRATAMIENTOS | Fila | Columna | | | |
|---------|--------------|------|---------|-------|-------|-------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | A | 1 | 30.56 | 5.56 | 8.33 | 25.00 |
| 1 | B | 2 | 22.22 | 19.44 | 19.44 | 16.67 |
| 1 | C | 3 | 16.67 | 11.11 | 11.11 | 8.33 |
| 1 | D | 4 | 30.56 | 13.89 | 13.89 | 38.89 |
| 2 | A | 1 | 13.89 | 11.11 | 16.67 | 16.67 |
| 2 | B | 2 | 0.00 | 22.22 | 16.67 | 22.22 |
| 2 | C | 3 | 22.22 | 8.33 | 19.44 | 16.67 |
| 2 | D | 4 | 25.00 | 19.44 | 22.22 | 16.67 |

Apéndice No 8. Matriz de datos de la variable severidad externa

| Replica | TRATAMIENTOS | Fila | Columna | | | |
|---------|--------------|------|---------|------|------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | A | 1 | 1.83 | 0.40 | 0.50 | 1.53 |
| 1 | B | 2 | 1.33 | 1.17 | 1.19 | 1.00 |
| 1 | C | 3 | 1.20 | 0.67 | 0.67 | 0.50 |
| 1 | D | 4 | 1.83 | 0.85 | 0.85 | 2.33 |
| 2 | A | 1 | 1.00 | 0.67 | 1.02 | 1.02 |
| 2 | B | 2 | 0.00 | 1.36 | 0.86 | 1.36 |
| 2 | C | 3 | 1.33 | 0.50 | 1.17 | 1.02 |
| 2 | D | 4 | 1.53 | 1.19 | 1.22 | 1.00 |

Apéndice No 9. Matriz de datos de la variable promedio ponderado de infección PPI

| Replica | TRATAMIENTOS | Fila | Columna | | | |
|---------|--------------|------|---------|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | A | 1 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| 1 | B | 2 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| 1 | C | 3 | 7 | 8 | 8 | 7 |
| 1 | D | 4 | 6 | 6 | 7 | 7 |
| 1 | A | 1 | 7 | 7 | 7 | 8 |
| 1 | B | 2 | 7 | 8 | 7 | 8 |
| 1 | C | 3 | 8 | 7 | 8 | 7 |
| 1 | D | 4 | 6 | 7 | 6 | 7 |

Apéndice No 10. Matriz de datos de la variable número de hojas