



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Proyecto de Investigación
previo a la obtención del título
de Ingeniero Agrónomo

Título del Proyecto de Investigación:

“Identificación y caracterización morfológica del agente patógeno que causa
la enfermedad del “dedo pudre” en el cultivo de Banano”

Autor:

Steven Alexander Loor Véliz

Director del Proyecto de Investigación:

Favio Eduardo Herrera Eguez, PhD.

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2020

El proyecto de investigación “**Identificación y caracterización morfológica del agente patógeno que causa la enfermedad del “dedo pudre” en el cultivo de Banano**”, se desarrolló bajo el convenio marco de cooperación interinstitucional entre la UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO y la Empresa REYBANPAC, REY BANANO DEL PACÍFICO C.A., firmado a los ocho días del mes de noviembre de 2018.



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **STEVEN ALEXANDER LOOR VÉLIZ**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado de calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en el documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondiente a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Atentamente;

STEVEN ALEXANDER LOOR VÉLIZ
AUTOR

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito **FAVIO EDUARDO HERRERA EGUEZ**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el estudiante **STEVEN ALEXANDER LOOR VÉLIZ**, realizó el Proyecto de Investigación titulado **“Identificación y caracterización morfológica del agente patógeno que causa la enfermedad del “dedo pudre” en el cultivo de Banano”**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Atentamente;

FAVIO EDUARDO HERRERA EGUEZ, PhD.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito **FAVIO EDUARDO HERRERA EGUEZ**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado **“Identificación y caracterización morfológica del agente patógeno que causa la enfermedad del “dedo pudre” en el cultivo de Banano”**, perteneciente al estudiante de la carrera de Ingeniería Agronómica **Steven Alexander Loor Véliz**, CERTIFICA: el cumplimiento de los parámetros establecidos por el SENESCYT, y se evidencia el reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico (URKUND) con un porcentaje de coincidencia del 2%.

URKUND	
Documento	Tesis 20-02-2020 FINAL URKUND.docx (D64184584)
Presentado	2020-02-20 17:52 (-05:00)
Presentado por	Favio (fherrerae@uteq.edu.ec)
Recibido	fherrerae.uteq@analysis.arkund.com
	2% de estas 18 páginas, se componen de texto presente en 4 fuentes.

FAVIO EDUARDO HERRERA EGUEZ, PhD.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO:

“Identificación y caracterización morfológica del agente patógeno que causa la enfermedad del “dedo pudre” en el cultivo de Banano”

Presentado a la comisión académica como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Autor:

Steven Alexander Loor Véliz

Aprobado por:

Dra. Mayra Vélez Ruiz
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dra. Marisol Rivero Herrada
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Javier Guevara Santana MSc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Jehová por brindarme fortaleza, sabiduría y salud para terminar con satisfacción el presente trabajo de investigación.

A mis padres, por todo su esfuerzo depositado en mí para continuar con mis estudios y quienes confiaron en todo momento, especialmente a mi madre dándome ejemplo de superación, humildad y perseverancia en cada circunstancia de la vida.

Le agradezco a mi director de tesis, Dr. Favio Herrera Eguez, por su enseñanza, apoyo y amistad que hizo posible la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

A los miembros del Tribunal de Sustentación, por las respectivas sugerencias en la redacción del presente Proyecto de Investigación.

Al Ing. Leonardo Matute Matute, Decano de la insigne Facultad de Ciencias Agrarias, por incentivar el liderazgo, superación y compartir sus conocimientos durante mis años de estudio.

A la empresa REYBANPAC C.A., por las facilidades para la ejecución de la investigación y el apoyo económico que ha solventado este trabajo de campo.

A mis compañeros de investigación: Ángel Cedeño, Jorge Rodríguez, Antonio Mendoza, Lucho Vera, Fernando Rico, Sergio Jácome, por esa amistad y confianza brindada en este tiempo. A mis amigos que han compartido en todos estos momentos de mi vida universitaria: Mafer Mesías, Andy Ramón, Bismara Pérez y al grupo de siempre.

También quiero expresar mi más profundo agradecimiento a una persona que me ha motivado y apoyado incondicionalmente en el transcurso de mi carrera universitaria, no fue sencillo culminar este proyecto, sin embargo, siempre fuiste ese plus para lograrlo con éxito.

Steven Loor Véliz

DEDICATORIA

Dedico con gratitud y orgullo, a todos los seres queridos quienes han sido un pilar importante para seguir adelante y motivándome diariamente.

A mis padres, Mery Véliz y Robert Loor por el amor y apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi vida.

Finalmente dedico a las futuras generaciones, que cada día es una nueva oportunidad para lograr lo que anhelamos con dedicación y trabajo.

¡NUNCA ES TARDE PARA EMPEZAR!

Steven Loor Véliz

RESUMEN

El cultivo de banano representa un rubro muy importante para nuestro país. Su productividad se ve mermada por el ataque de fitopatógenos, entre ellos se encuentra el dedo pudre que es una de las enfermedades que ataca a frutos del cultivo de banano, originando pérdidas económicas a los agricultores. La presente investigación tuvo como objetivo identificar, caracterizar y evaluar cinco controles fitosanitarios aplicados en el cultivo de banano sobre el desarrollo de la enfermedad. Las muestras fueron tomadas de frutos provenientes de la Hacienda “María Cristina”, perteneciente a la empresa Reybanpac, ubicada en el Recinto Minuapi, cantón Valencia, provincia de Los Ríos. De acuerdo a una serie de pruebas en laboratorio sobre su patogenicidad y caracterización por descarte de medios fue posible identificar a la bacteria del género *Erwinia* como agente causal del dedo pudre. Posteriormente, se efectuó un ensayo *in vitro* con la aplicación de cinco productos fitosanitarios sobre el crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) de la bacteria en las dosis baja, media y alta. Se evaluaron 16 tratamientos en cuatro repeticiones y se aplicó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad. Los resultados demostraron que la aplicación de CUPROSPOR en dosis alta (0.50 ml) generó un bajo crecimiento de colonias con un promedio de 40.5 (UFC), mientras que la aplicación del producto PROGANIC Mega en dosis alta (1.0 ml) permitió el crecimiento promedio de 56.3 (UFC), siendo los productos más eficaces en el control del crecimiento bacteriano de *Erwinia* a nivel *in vitro* en comparación a los demás tratamientos evaluados que presentaron promedios de 68.0 (UFC) hasta 191.25 (UFC).

Palabras claves: Fitopatógenos, fruto de banano, *Erwinia*, agroquímicos

ABSTRACT

Banana cultivation represents a very important area for our country. Its productivity is decreased by the attack of phytopathogens. Among them there is the dedo pudre, one of the diseases that attacks fruits of banana cultivation, causing economic losses to the farmers. The purpose of this research was to identify, characterize and evaluate five phytosanitary products applied in banana cultivation on the development of the disease. The samples were taken from fruits in the "María Cristina" farm, belonging to the Reybanpac company, located in the Minuapi, located in Valencia, Los Ríos state. According to a serie of laboratory tests on its pathogenicity and media discard characterization it was possible to identify the bacteria of the *Erwinia* genus as a causal agent of the dedo pudre. Subsequently, one in vitro test was carried out with the application of five phytosanitary products on the growth of colony forming units (CFU) of the bacteria at low, medium and high doses. Sixteen treatments were evaluated in four repetitions and the Tukey test was applied to a 95% of probability. The results showed that the application of CUPROSPOR in high dose (0.50 ml) generated low colony growth with an average of 40.5 (CFU), while the application of the product PROGANIC Mega in high dose (1.0 ml) allowed the average growth of 56.3 (CFU), being the most effective products in controlling *Erwinia* bacterial growth at the in vitro level compared to other evaluated treatments that averaged 68.0 (CFU) to 191.25 (CFU).

Keywords: Phytopathogens, banana fruit, *Erwinia*, agrochemicals

ÍNDICE

Declaración de autoría y cesión de derechos	iii
Certificación de culminación del proyecto de investigación.....	iv
Reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico	v
Agradecimientos	vii
Dedicatoria.....	viii
Resumen	ix
Abstract.....	x
Índice	xi
Índice de tablas	xiii
Índice de figuras	xiv
Índice de anexos	xvi
Código dublin	xvii
Introducción.....	1

CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación	4
1.2. Objetivos	6
1.2.1. Objetivo general	6
1.2.2. Objetivos específicos.....	6
1.3. Justificación	7

CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco teórico	10
2.1.1. Generalidades del cultivo de banano (<i>Musa acuminata</i> L.).....	10
2.1.2. Principales sectores de producción.....	10
2.1.3. Descripción botánica	10
2.1.4. Importancia económica del banano en Ecuador.....	11
2.1.5. Enfermedades causantes de la pudrición de los dedos en banano.....	11
2.1.6. Identificación morfológica de bacterias	15
2.1.7. Postulados de Koch y pruebas de patogenicidad.....	15
2.1.8. Técnica de caracterización por descarte de medios.....	16
2.1.9. Productos fitosanitarios utilizados para el control de enfermedades en banano ...	17

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.	Localización de la investigación	20
3.2.	Tipo de investigación.....	20
3.3.	Método de investigación	21
3.4.	Fuentes de recopilación de información	21
3.5.	Diseño experimental y análisis estadístico	21
3.6.	Instrumentos de investigación.....	22
3.6.1.	Factores en estudio	22
3.6.2.	Tratamientos evaluados	22
3.7.	Manejo del experimento	23
3.8.	Recursos humanos y materiales	28
3.9.	Financiamiento	29

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Resultados	31
4.1.1.	Aislamiento y purificación del agente causal	31
4.1.2.	Pruebas de patogenicidad	32
4.1.3.	Caracterización por descarte de medios	34
4.1.4.	Efecto <i>in vitro</i> de los agroquímicos sobre el crecimiento de colonias del agente causal.....	37
4.2.	Discusión.....	42

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	Conclusiones	45
5.2.	Recomendaciones	46

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

6.1.	Bibliografía	48
------	--------------------	----

CAPÍTULO VII. ANEXOS

7.1.	Anexos	53
------	--------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características climáticas de la zona de estudio.....	20
Tabla 2. Esquema del análisis de varianza utilizado en el ensayo.....	21
Tabla 3. Tratamientos en estudio utilizado en el ensayo <i>in vitro</i>	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Característica morfológica de un conidióforo de <i>Verticillium theobromae</i>	12
Figura 2. Síntomas en dedos de banano causados por <i>Verticillium theobromae</i>	12
Figura 3. Colonias de <i>Erwinia</i> sp., desarrolladas medio agar nutriente.....	13
Figura 4. Síntomas en frutos causados por <i>Erwinia carotovora</i>	14
Figura 5. Síntomas observados en banano a nivel de poscosecha. a) Pudrición suave observado en racimos del banano. b) Dedos de banano con síntomas avanzados de la enfermedad.....	31
Figura 6. Colonias usadas para la caracterización luego de comprobar su patogenicidad por postulados de Koch. a) Colonias con pigmentación crema en medio King B b) Colonias con pigmentación blanca en King B.	32
Figura 7. Inoculación del dedo de banano en condiciones de laboratorio.	32
Figura 8. Síntomas presentados luego de la inoculación de los dedos de banano con la bacteria aislada. a) Fruto de banano inoculado a los 9 días. b) Fruto de banano control.....	33
Figura 9. Sitios de inoculación bacteriana en plantas de banano de dos semanas de fructificación. a) Inoculación sobre la superficie de la fruta. b) Inoculación dentro del estigma de la flor.	33
Figura 10. Tinción de Gram en la bacteria aislada.....	34
Figura 11. Prueba de anaerobiosis en cultivo King B. La ausencia de crecimiento bacteriano muestra una reacción negativa.	35
Figura 12. Crecimiento bacteriano en medio King B presentando una tonalidad crema indicando negativo para <i>Pseudomonas</i>	35
Figura 13. Crecimiento bacteriano en medio YDC con una tonalidad blanquecina indicando negativo para <i>Xanthomonas</i>	36
Figura 14. Caracterización a nivel de género por descarte de medios bacterianos.	37

Figura 15. Número de (UFC) en el tratamiento TIMOREX Gold en diferentes dosis a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$) Las barras representan desviación estándar.....	37
Figura 16. Número de (UFC) en el tratamiento PROGANIC Mega en diferentes dosis a las 18, 24 y 48 horas respectivamente.	38
Figura 17. Número de (UFC) en el tratamiento PRIMEBACT Plus en diferentes dosis a las 18, 24 y 48 horas respectivamente.	39
Figura 18. Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en el tratamiento CUPROSPOR en diferentes dosificaciones a las 18, 24 y 48 horas respectivamente.	39
Figura 19. Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en el tratamiento COOPER en diferentes dosificaciones a las 18, 24 y 48 horas.	40
Figura 20. Análisis de los tratamientos evaluados frente las dosificaciones después de las 48 horas del conteo de UFC.	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Proceso para la obtención de aislados bacterianos obtenidos de los dedos de banano con sintomatología al dedo pudre.....	53
Anexo 2. Inoculaciones a dedos de banano con las cepas bacterianas aisladas en condiciones de laboratorio.....	53
Anexo 3. Inoculación en condiciones de campo de las doce cepas bacterianas aisladas previamente en laboratorio.....	54
Anexo 4. Recuperación de dos cepas patogénicas que causaron los mismos síntomas de la enfermedad en campo.....	54
Anexo 5. Metodología empleada para la caracterización del agente causal por descarte de medios.....	55
Anexo 6. Pruebas de caracterización realizadas para identificación del género.	56
Anexo 7. Dosis e ingrediente activo de los tratamientos evaluados a nivel <i>in vitro</i>	56

CÓDIGO DUBLIN

Título:	“Identificación y caracterización morfológica del agente patógeno que causa la enfermedad del “dedo pudre” en el cultivo de Banano”
Autor:	Steven Alexander Loor Véliz
Palabras claves:	Fitopatogenos, fruto de banano, <i>Erwinia</i> , agroquímicos
Fecha de publicación:	
Editorial:	
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>El cultivo de banano representa un rubro muy importante para nuestro país. Su productividad se ve mermada por el ataque de fitopatógenos, entre ellos se encuentra el dedo pudre que es una de las enfermedades que ataca a frutos del cultivo de banano, originando pérdidas económicas a los agricultores. La presente investigación tuvo como objetivo identificar, caracterizar y evaluar cinco controles fitosanitarios aplicados en el cultivo de banano sobre el desarrollo de la enfermedad. Las muestras fueron tomadas de frutos provenientes de la Hacienda “María Cristina”, perteneciente a la empresa Reybanpac, ubicada en el Recinto Minuapi, cantón Valencia, provincia de Los Ríos. De acuerdo a una serie de pruebas en laboratorio sobre su patogenicidad y caracterización por descarte de medios fue posible identificar a la bacteria del género <i>Erwinia</i> como agente causal del dedo pudre. Posteriormente, se efectuó un ensayo <i>in vitro</i> con la aplicación de cinco productos fitosanitarios sobre el crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) de la bacteria en las dosis baja, media y alta. Se evaluaron 16 tratamientos en cuatro repeticiones y se aplicó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad. Los resultados demostraron que la aplicación de CUPROSPOR en dosis alta (0.50 ml) generó un bajo crecimiento de colonias con un promedio de 40.5 (UFC), mientras que la aplicación del producto PROGANIC Mega en dosis alta (1.0 ml) permitió el crecimiento promedio de 56.3 (UFC), siendo los productos más eficaces en el control del crecimiento bacteriano de <i>Erwinia</i> a nivel <i>in vitro</i> en comparación a los demás tratamientos evaluados que presentaron promedios de 68.0 (UFC) hasta 191.25 (UFC).</p>
Descripción:	
URI:	

INTRODUCCIÓN

En Ecuador, el banano es una fruta de gran importancia, la cual ocupa alrededor del 92% de la producción total del país. El grado económico de esta planta se refleja en su representación dentro del PIB agrícola, que alcanza hasta el 50%.

El banano tiene una superficie sembrada de 190,381 hectáreas según la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria (2019) están distribuidas en las siguientes provincias: Los Ríos, Guayas, El Oro, Esmeraldas y Manabí con una producción promedio de 2,900 cajas por hectárea ocupando el primer puesto en el mercado de exportación nacional.

Según el Ministerio de Agricultura del Ecuador (2016), el sector bananero genera cerca de 2 a 2.5 millones puesto de trabajo, de forma directa como indirectamente asumiendo un promedio de empleo directo de 0.8 personas por hectárea. Al ser un cultivo perenne que se produce de manera extensiva, coexisten varios problemas bióticos y abióticos que reducen su producción (Fabra, 2015). En ciertas ocasiones, las enfermedades pueden causar la pérdida del 100% de la producción.

Dentro de los factores limitantes del cultivo de banano se encuentran el ataque de plagas y enfermedades que reducen la calidad y productividad de las cosechas. El fruto del banano es una de las estructuras frecuentemente atacadas por enfermedades, produciendo índices de daños que afectan los ingresos de los agricultores.

Existen varias enfermedades que se desconoce el agente causal, para ello el uso de técnicas apropiadas para su identificación son extremadamente necesarias, especialmente cuando se planean medidas de control.

Para determinar el patógeno del dedo pudre es necesario la aplicación de técnicas de identificación por descartes de medios que son: tinción de Gram, prueba de anaerobiosis, colonias fluorescentes en medio King B, colonias amarillas en medio YDC y crecimientos de colonias en medio D1M agar. La utilización de las diferentes pruebas mencionadas permitirá identificar a nivel de género el agente causal de la enfermedad.

Por los motivos anteriormente señalados, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo identificar, caracterizar y evaluar cinco controles fitosanitarios sobre el desarrollo de la enfermedad del “dedo pudre” en el cultivo de banano. Esta información permitirá establecer estrategias eficientes para el control del agente causal y elegir el producto comercial y dosis más apropiada. Se espera que los resultados obtenidos contribuyan a la optimización de los recursos utilizados en las plantaciones comerciales de banano de la región.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

Las enfermedades son el factor biótico de mayor impacto para la producción de banano en Latinoamérica y el mundo. La enfermedad conocida como “dedo pudre” genera daños importantes que se atribuye directamente en los frutos de banano, causando grandes daños en la producción a muchos productores de la zona y del país generando pérdidas económicas considerables.

En la actualidad existe varios productos fitosanitarios aplicados en el cultivo de banano con el objetivo de controlar la enfermedad del dedo pudre, pero se desconoce su eficacia en el control de esta enfermedad, por tal razón es importante determinar el agente causal de esta enfermedad y el producto que muestre mayor eficiencia en la inhibición de dicha enfermedad.

Con la identificación del agente patógeno, empleando herramientas de identificación y caracterización, y el reconocimiento del producto fitosanitario más adecuado para su control el desarrollo de estrategias de control del dedo pudre en plantaciones comerciales de banano de la región se minimizarán los daños de la enfermedad y optimizarán los recursos disponibles.

1.1.2. Formulación del problema

¿Qué agente causal es responsable de la enfermedad del dedo pudre y entre los productos fitosanitarios evaluados cuál es el más eficiente?

1.1.3. Sistematización del problema

En base a la problemática anteriormente abordada se plantean las siguientes directrices en el trabajo:

¿La técnica de descarte de medios y observaciones a nivel microscópico permite caracterizar el agente causal del dedo pudre?

¿Se podrá aislar de los frutos de banano el agente causal del dedo pudre realizando los postulados de Koch?

¿Cuál es el efecto de la aplicación de cinco productos fitosanitarios sobre el desarrollo del dedo pudre en condiciones *in vitro*?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Identificar, caracterizar y evaluar cinco controles sobre el desarrollo de la enfermedad del “dedo pudre” en el cultivo de banano.

1.2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el agente causal empleando la técnica por descarte de medios y observaciones a nivel microscópico.
- Efectuar pruebas de patogenicidad realizando los postulados de Koch con el agente causal aislado proveniente de frutos de banano.
- Determinar el efecto de la aplicación de cinco productos sobre el desarrollo de la enfermedad en condiciones *in vitro*.

1.3. Justificación

El banano representa una fuente importante de ingresos para el Ecuador. Dentro del PIB total, las exportaciones de banano representan el 4%, es decir cerca de 1,017 millones de dólares anuales. En el año 2018, alrededor de 230,000 ha fueron plantadas de banano en el Ecuador, convirtiéndose en el principal cultivo del país (INEC, 2018).

La mayoría de investigaciones que se realizan en el cultivo de banano tratan solamente en enfermedades que afectan a las hojas tales como la sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*) y pudrición de la corona (*Fusarium* spp.), sin embargo, la fruta de banano también puede ser afectada directamente por varias enfermedades. Una de las enfermedades del que no existe información exacta del agente causal es el dedo pudre. Esta enfermedad provoca inicialmente una pudrición suave en los dedos del racimo de banano hasta llegar al punto de necrosis totalmente el fruto.

La pérdida de dedos en los racimos de banano por causa de esta enfermedad repercute directamente tanto a grandes como pequeños productores de banano del país. Como consecuencia del desconocimiento del agente causal del dedo pudre en los racimos de banano la aplicación intensiva y sin éxito de productos fitosanitarios (fungicidas, bactericidas) con el objetivo de reducir los daños ha sido la principal estrategia de manejo de esta enfermedad.

El uso de plaguicidas en la industria bananera cada vez se torna más restringido debido a disposiciones de los propios países importadores de la fruta, además el desconocimiento del agente causal limita el manejo y control de esta enfermedad, por este motivo es necesario la identificación y búsqueda de alternativas fitosanitarias encaminadas al uso de técnicas de manejo y control de esta enfermedad que permitan optimizar los recursos disponibles y evitar pérdidas económicas.

Esta investigación nace de la necesidad de identificar el agente patógeno causante de la enfermedad del “dedo pudre”. Este problema se encuentra presente en el cultivo de banano en muchas localidades del país, sin embargo, muy poca atención ha sido colocada. Con los resultados obtenidos de esta investigación se espera ampliar el conocimiento general del

agente causal de la enfermedad en estudio, combatir el problema considerando las alternativas de control y evitar pérdidas en la producción bananera.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Teórico

2.1.1. Generalidades del cultivo de banano (*Musa acuminata* L.)

El banano es considerado uno de los cultivos de mayor importancia en el mundo, detrás del arroz, el trigo y el maíz. También es denominado un producto básico y de exportación, ya que establece una importante fuente de empleo e ingresos a nuestro país (INFOAGRO, 2015).

2.1.2. Principales sectores de producción

Las principales provincias productoras en Ecuador son Los Ríos con 56,045.88 ha sembradas, Guayas con 50,719.04 y El Oro con 49,129.50 ha mientras que el resto de las provincias en conjunto cuentan con 15,002.02 ha (Pacheco, 2014).

2.1.3. Descripción botánica

El banano es una planta herbácea, que pertenece al grupo de las musáceas, posee un pseudotallo aéreo que se origina de cormos, en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales conocidas como “hijos” (Ruiz, 2012).

La clasificación taxonómica del cultivo de banano es la siguiente (Soto, 2002).

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Liliopsida
- **Orden:** Zingiberales
- **Familia:** Musaceae
- **Genero** *Musa*
- **Especie** *acuminata*

2.1.4. Importancia económica del banano en Ecuador

El Ecuador es el primer exportador de banano en el mundo con un 35% del mercado global y el quinto productor en el planeta con una producción de 6,583.477 Tm superado por India que es el primer productor de banano con una producción anual 29,124.000 Tm (Cepeda, 2011).

En el 2016, el sector bananero ecuatoriano generó un ingreso de 2,600 millones de dólares, con un precio de la caja de 43.0 libras que tuvo un valor promedio de \$ 6.16 dólares. La provincia del Guayas representó el 73.15% de las ventas, la provincia de Los Ríos se ubicó en segundo lugar con una participación en el mercado del 14.28% del total generado y El Oro se ubicó en tercer lugar con una participación en el mercado del 12.57% (PROECUADOR, 2017).

2.1.5. Enfermedades causantes de la pudrición de los dedos en banano

El banano es una planta herbácea susceptible a muchas enfermedades dependiendo de su variedad, tales como las que son causadas por hongos y bacterias que afectan directamente la calidad de la fruta.

Entre los principales problemas fitosanitarios que afectan la calidad del fruto destacan las enfermedades fúngicas ocasionadas por podredumbre de la punta del cigarro (*Verticillium theobromae*), además enfermedades bacterianas como la pudrición interna del fruto causada por (*Pseudomonas* sp.) y finalmente tenemos a la pudrición suave del fruto (*Erwinia carotovora*).

2.1.5.1. Podredumbre de la punta del cigarro (*Verticillium theobromae*)

En la podredumbre de la punta del fruto de banano, la superficie de la lesión se cubre de blanco las esporas que se tornan de color rosado o marrón según su maduración, dando a la punta del dedo una apariencia de color grisáceo, que generalmente es asociado con la podredumbre de la punta del cigarro. La pulpa sufre una pudrición seca y se momifica (Ploetz, 2003).

a) Morfología

Los conidios son ovoides o elipsoides y generalmente son unicelulares. Se originan en las fiálides que son hifas especializadas producidas en un espiral alrededor de cada conidióforo (Figura 1), cada fiálide lleva una masa de conidios (Agrios, 2005).



Figura 1: Característica morfológica de un conidióforo de *Verticillium theobromae*.

Fuente: (Ploetz, 2003).

b) Sintomatología

Entre los síntomas presente en la fruta surge una necrosis negra se extiende desde el perianto hasta la punta de los dedos inmaduros. La pulpa de la fruta infectada sufre una podredumbre seca el tejido necrótico corrugado se cubre con los micelios del hongo y se asemeja a la ceniza grisácea del extremo del cigarro (Figura 2). En los dedos emergentes se ven afectados, los dedos enteros a veces se pudren (Ploetz, 2003).



Figura 2: Síntomas en dedos de banano causados por *Verticillium theobromae*.

Fuente: (Ploetz, 2003).

c) Fuentes de inóculo y diseminación

La podredumbre de la punta del cigarro aumenta durante los períodos de alta humedad y constantes precipitaciones. Los conidios de *V. theobromae* son diseminados por el viento e infectan partes de flores, este hongo es un colonizador común de las flores de banano y hojas, el crecimiento óptimo ocurre a 25°C y altas incidencias de lluvia.

2.1.5.2. Pudrición suave del fruto (*Erwinia carotovora*)

La pudrición suave del dedo es una enfermedad pre-cosecha del fruto de banano, que puede causar severas pérdidas en producción. El agente causal es la bacteria *Erwinia carotovora*, la cual es un habitante nativo en las plantaciones de banano.

Con la implementación generalizada de la práctica del desflore en el campo y la renovación de plantaciones, dichos factores contribuyen con la diseminación del patógeno y crean condiciones muy favorables para el desarrollo de la enfermedad (Martínez *et al.*, 2013).

a) Morfología

El género *Erwinia* son bacterias gram negativa peritricamente flagelado presenta bastones rectos, con dimensiones de 0.5 a 1.0 x 1.0 a 3 µm (Figura 3), se desplazan por medio de varios flagelos peritricos (rodeada de muchos pelos), estas son las únicas bacterias fitopatógenas que son anaerobias facultativas (Agrios, 2005).

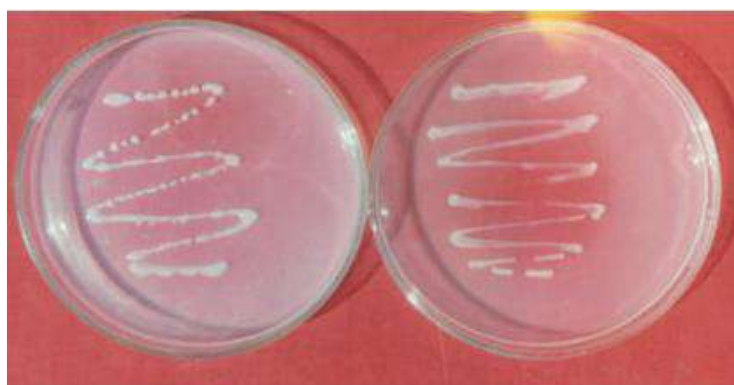


Figura 3: Colonias de *Erwinia* sp., desarrolladas medio agar nutriente.

Fuente: (Snehalatharani y Khan, 2010).

b) Sintomatología

La primera sintomatología externa de un dedo con la pudrición suave, consiste en la aparición de una pequeña área (6-8 mm de diámetro) en la cáscara con apariencia húmeda o grasosa generalmente cercana a la punta del dedo (Figura 4).

Gradualmente, esta área aumenta de tamaño y en término de 24 horas aparece una necrosis evidente del tejido de la cáscara (León, 2007).



Figura 4: Síntomas en frutos causados por *Erwinia carotovora*

Fuente: (León, 2007).

c) Fuentes de inóculo y diseminación

La principal fuente de inóculo de la pudrición suave del dedo de banano son los frutos enfermos que presentan esa mancha grasosa de color marrón. Sin embargo, se ha demostrado que la bacteria sobrevive en tejidos en descomposición, restos de las hojas producto de la labor de deshoje, en los pseudotallos de plantas y en los estigmas florales (Martínez *et al.*, 2013).

No obstante, la bacteria puede alcanzar el fruto por formas naturales, como producto de la lluvia y por vectores como insectos. Sin embargo, el desarrollo de esta enfermedad siempre ha estado relacionado con el desflore en el campo, ya que durante dicha labor el trabajador disemina directamente y facilita la infección del patógeno al fruto de banano (Martínez *et al.*, 2013).

2.1.6. Identificación morfológica de bacterias

Es importante la identificación preliminar a nivel morfológico de las bacterias para la diferenciación con otros microorganismos. Para su observación es de preferencia observar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos (Jurado, 2005).

El aislamiento de bacterias en cultivo puro, está compuesta por un solo tipo de microorganismos. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones aptas se representan por sus características como lo son: tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color (Jurado, 2005).

2.1.7. Postulados de Koch y pruebas de patogenicidad

Los postulados de Koch son procedimientos experimentales sistematizados que permiten revelar la relación causa-efecto entre la enfermedad y el microorganismo estudiado (Fuentes, 2007).

En la rama de la fitopatología se emplea los postulados cuando no se tiene la seguridad o información bibliográfica que respalde supuestos, de que cierto patógeno ocasione dicha enfermedad (Volcy, 2008). Koch reveló que el patógeno podría ser aislado del organismo enfermo y llevado a laboratorio sin perder su capacidad patogénica, en el momento que se inoculaba a nuevos individuos se evidenciaba la misma enfermedad. A partir de aquellas investigaciones planteó los siguientes postulados:

1. El agente patógeno debe estar presente en cada caso de la enfermedad en condiciones apropiadas y ausente en organismos sanos.
2. El posible agente causal debe ser aislado en un cultivo puro en condiciones de laboratorio.
3. El agente causal inoculado a otro individuo debe manifestar la misma enfermedad.
4. El agente causal debe aislarse una vez más a un cultivo puro (Fuentes *et al.*, 2007).

2.1.8. Técnica de caracterización por descarte de medios

La técnica de caracterización por descarte de medios consiste en la utilización de diversas técnicas mediante la aplicación de medios diferenciales semi-selectivos, pruebas de diagnóstico rápido y de patogenicidad que se utilizan para la diferenciación de diferentes géneros bacterianos (Schaad *et al.*, 2001).

2.1.8.1. Tinción de Gram

En el análisis morfológico para la identificación de bacterias, la tinción de Gram es una prueba importante que permite clasificar a las bacterias en dos grupos: las que absorben el colorante básico cristal violeta, son las bacterias Gram positivas, y las que pierden ese colorante por el lavado, pertenecen a las Gram negativas (Forbes *et al.*, 2009).

2.1.8.2. Crecimiento anaeróbico

Los organismos anaerobios para crecer sobre superficie de un medio de cultivo no utilizan oxígeno en su proceso metabólico. Algunos organismos anaeróbicos usan fermentación, mientras que otros usan la respiración anaeróbica. Los anaeróbicos facultativos pueden optar entre uno u otro sistema dependiendo de las condiciones ambientales que se encuentren (La Scola *et al.*, 2014).

2.1.8.3. Colonias fluorescentes en medio King B

Es el mejor medio de aislamiento general para bacterias. Las *Pseudomonas* fluorescentes producen un pigmento amarillo que florecen bajo la luz ultravioleta de 366 nm. Este medio no es apropiado para el almacenamiento a largo plazo de *Erwinia* porque sus colonias pueden morir en muy pocos días a una semana (Braga, 2015).

2.1.8.4. Colonias amarillas en medio YDC

El medio YDC (carbonato de calcio, dextrosa y levadura) es un medio no selectivo que se utiliza, para cultivar colonias del género de las *Xantomonas* (colonias amarillas) y del género

de los *Clavibacter* (colonias naranjas). Este tipo de medio de cultivo es útil para la caracterización de estas especies de bacterias que tienen características convexas y brillantes (Braga, 2015).

2.1.8.5. Crecimiento en medio D1M Agar

Es un medio de cultivo útil para diferenciar *Agrobacterium* de *Burkholderia*, *Erwinia* y *Ralstonia*. Debe existir un crecimiento de las colonias de *Agrobacterium* en un lapso de tiempo de 2 a 5 días después de haber realizado la siembra en el medio (Braga, 2015).

2.1.9. Productos fitosanitarios utilizados para el control de enfermedades en banano

2.1.9.1. TIMOREX GOLD

El producto Timorex Gold con acción biofungicida con amplio espectro de acción que se utiliza en el control preventivo y curativo de la Sigatoka negra, es una herramienta para la producción sostenible de banano, con importantes valores agregados para el hábitat y el medio ambiente. Los elementos naturales derivados de *Melaleuca alternifolia* brindan varios modos de acción sobre las células de hongos y bacterias (Syngenta, 2019).

La actividad antimicrobiana del producto contra hongos patógenos es resultado de su capacidad de descomponer la barrera de permeabilidad de las estructuras de la membrana de organismos vivos (Syngenta, 2019).

Dosis: La dosis de aplicación del producto según las especificaciones de la etiqueta es de 1.0 a 2.0 L/ha.

2.1.9.2. PROGRANIC Mega

Es un producto fungicida-bactericida que contiene extracto de la planta conocida como gobernadora, que incluye resinas y ácidos orgánicos con acción fungicida y repelente. Inhibe la germinación de esporas y el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos, de gran utilidad

para el control de marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) y fusariosis (*Fusarium oxysporum*) (Febeabio, 2015).

Dosis: La aplicación del producto según las especificaciones de la etiqueta es de 1.0 a 2.0 L/ha.

2.1.9.3. PRIMEBACT Plus

Es un fungicida bactericida de alta eficacia para el control de enfermedades bacterianas ya que el amonio cumple con la función de bloquear la acción de enzimas de la pared celular de las bacterias mediante un proceso de desnaturalización, inhibiendo las reacciones bioquímicas e induciendo la plasmólisis. Por otro lado, el efecto tóxico del sulfato sobre los hongos se manifiesta por la inhibición en la germinación de esporas y reduciendo el crecimiento del micelio (Alonso, 2014).

Dosis: La dosis de aplicación del producto en el cultivo de banano es de 0.20 a 0.50 L/ha.

2.1.9.4. COOPER

Es un producto predestinado a remediar las carencias de cobre, ya que es un elemento esencial en los cultivos para la estimulación de los sistemas enzimáticos en agrupación con otros elementos esenciales para la planta, y es particularmente activo en muchas de las rutas metabólicas en la célula (Alonso, 2014).

Dosis: La dosis de aplicación del producto en el cultivo de banano es de 1.0 a 1.5 L/ha.

2.1.9.5. CUPROSPOR

Este producto es un promotor de autodefensa de plantas y un poderoso fungicida-bactericida de alto espectro que controla enfermedades en una extensa gama de cultivos, sean estos anuales, anuales o perennes, incentiva la formación y el aumento de la concentración de esta sustancia de autodefensa contra los organismos fitopatógenos.

Dosis: La dosis de aplicación del producto en el cultivo de banano es de 0.50 a 1.0 L/ha.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización de la investigación

Los ensayos realizados en condiciones de laboratorio se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología y Biología molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo. Sus coordenadas geográficas son 01° 00' 737" de latitud Sur y 79° 28' 162" de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm.

Los ensayos de campo se realizaron en la Hacienda “María Cristina” ubicada en el Recinto Minuapi, Cantón Valencia, Provincia de Los Ríos. Posesionada geográficamente en las coordenadas 01° 01' 30" latitud Sur y 79°22' 01" longitud Occidental.

Las condiciones climáticas de la zona donde se realizó el ensayo de campo, presentaron las siguientes características climáticas (Tabla 1).

Tabla 1: Características climáticas de la zona de estudio.

Parámetros	Características
Temperatura max.	23.1 °C
Temperatura min.	33.6 °C
Precipitación	3111 mm
Heliofanía	898 horas
Humedad relativa	89 %

Fuente: Estación meteorológica, empresa Reybanpac.

3.2. Tipo de investigación

El proyecto de investigación es de tipo experimental y fue realizado en condiciones de laboratorio, se realizó una caracterización a nivel morfológico para identificar el agente patógeno causante de la enfermedad en los dedos de banano aislado de la finca antes mencionada.

3.3. Método de investigación

Para esta investigación se emplearon los métodos deductivos y de observación considerando la bibliografía mencionada en este proyecto para la identificación del agente causal de la enfermedad del “dedo pudre” del cultivo de banano.

3.4. Fuentes de recopilación de información

Para la investigación se recopiló información de fuentes tanto primarias como secundarias:

- **Fuentes primarias:** Información a través de la observación directa de los resultados que se logren obtener al final del ensayo.
- **Fuentes secundarias:** Información extraída de revistas, artículos científicos, libros, tesis y boletines divulgativos.

3.5. Diseño experimental y análisis estadístico

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con 15 tratamientos en cuatro repeticiones cada uno, más un control (Tabla 2). Cada unidad experimental consistió por una caja Petri. Los datos se procesaron mediante análisis de varianza y las medias se compararon por la Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para establecer las diferencias estadísticas entre las medias de cada tratamiento en estudio. El procesamiento estadístico de los datos se lo realizó con el software estadístico InfoStat (Di *et al.*, 2018).

Tabla 2. Esquema del análisis de varianza utilizado en el ensayo.

Fuente de variación	Grados de libertad
Repeticiones (r-1)	3
Tratamientos (t-1)	15
Error (t-1) (r-1)	45
Total	63

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Factores en estudio

Se estudiaron dos factores:

Factor A: Productos fitosanitarios

A₁: TIMOREX Gold

A₂: PROGRANIC Mega

A₃: PRIMEBACT Plus

A₄: COOPER

A₅: CUPROSPOR

Factor B: Dosis

B₁: Baja

B₂: Media

B₃: Alta

3.6.2. Tratamientos evaluados

Con la combinación de los dos factores productos fitosanitarios y dosificaciones se establecieron 15 tratamientos más un control sin aplicación de productos, se detallan a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos en estudio utilizado en el ensayo *in vitro*.

Tratamientos	Productos fitosanitarios	Dosis	Especificaciones (ml/250 ml medio)
1	TIMOREX Gold	Baja	0.50
2	TIMOREX Gold	Media	0.75
3	TIMOREX Gold	Alta	1.0
4	PROGRANIC Mega	Baja	0.50
5	PROGRANIC Mega	Media	0.75
6	PROGRANIC Mega	Alta	1.0
7	PRIMEBACT Plus	Baja	0.10
8	PRIMEBACT Plus	Media	0.18
9	PRIMEBACT Plus	Alta	0.25
10	COOPER	Baja	0.50
11	COOPER	Media	0.63
12	COPPER	Alta	0.75
13	CUPROSPOR	Baja	0.25
14	CUPROSPOR	Media	0.38
15	CUPROSPOR	Alta	0.50
16	Control	-----	-----

3.7. Manejo del experimento

3.7.1. Recolección de muestras

Se recolectaron muestras que presentaron como sintomatología pudrición suave color marrón en frutos de banano de la finca “María Cristina”. Las muestras fueron guardadas en bolsas de papel con la finalidad de reducir el exceso de humedad, posteriormente fueron colocadas en fundas ziploc con su respectiva codificación y se trasladaron inmediatamente al laboratorio de Microbiología perteneciente a los predios de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

3.7.2. Aislamiento y purificación

Las muestras recolectadas se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Con un bisturí estéril se cortaron pequeños trozos en el área que presentaban síntomas de la pudrición de 0.5 x 0.5 cm de tejido, estos se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 1 min, luego se enjuagaron dos veces con agua destilada. Posteriormente, se dejaron secar las muestras de banano obtenidas de los pequeños cortes por un lapso de 10 minutos, una vez secas, los trozos estériles de banano se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo *Pseudomonas* agar y se incubaron a una temperatura de 28 °C en oscuridad durante un periodo de 24 horas.

3.7.3. Siembra del material en medios de cultivo

De las muestras previamente desinfectadas se tomaron pequeños segmentos de tejidos del fruto enfermos y se los sembró en cajas Petri con medio de cultivo *Pseudomonas* agar, con la finalidad de realizar el aislamiento de los agentes patogénicos. La purificación consiste en realizar pequeños cortes con un bisturí estéril del borde de la colonia en crecimiento, luego dicho corte se depositó en otras cajas con medios de cultivo estéril y de esta forma se obtuvo el medio de cultivo puro.

3.7.4. Ensayos de patogenicidad

Para realizar los postulados de Koch o también denominadas ensayos de patogenicidad se tomaron dedos sanos del racimo donde se realizaron tres tipos de inoculaciones siguiendo la metodología de Lee *et al.*, (2003).

- Primero se colocó un disco de agar de 0.8 cm de diámetro con colonias del patógeno sobre la cascará de la fruta y se dejaron sobre cámaras húmedas en condiciones controladas.
- Se efectuaron inoculaciones realizando una herida en el pedúnculo del dedo del banano con una punta amarilla, se procedió con una pipeta a pinchar la superficie de la cáscara de la fruta y se agregó una suspensión bacteriana de 10^8 UFC/ml.

- Por último, se realizaron inoculaciones en campo a racimos de banano de 2 semanas donde se asperjó una suspensión de bacterias, sobre el estigma del dedo de banano en una suspensión de 10^8 UFC/ml.

3.7.5. Caracterización por descarte de medios

Para la caracterización por descarte de medios se empleó la metodología descrita por Schaad *et al.*, (2001), observando al microscopio y al estereoscopio las variables físicas de las bacterias como su forma, tamaño, borde, elevación, color y pared celular.

3.7.5.1. Tinción de gram

Las tinciones de gram se realizó con colonias de los aislamientos bacterianos de 24 horas de crecimiento tomadas de las cepas bacteriana aisladas. Una vez adquiridas las colonias aisladas, se tomó una pequeña masa del microorganismo y se realizó un frotis en un portaobjeto. Una vez seca y fijo la muestra se aplica el cristal de violeta dejando actuar por un minuto. Posteriormente, se aplicó 1 ml de lugol se dejó actuar por el lapso de un minuto. A la muestra obtenida se le aplicó 1 ml alcohol acetona por treinta segundos, finalmente se aplicó la fucsina en la cantidad de 1 ml se dejó actuar por un minuto y se lavó con agua.

3.7.5.2. Prueba de anaerobiosis

Se prepararon tubos totalmente estériles con medio de cultivo *Pseudomonas* agar en volumen de 5 ml en tubos halcón (10 ml). Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente para la siembra del inóculo que fue a una cantidad de 10^3 UFC por cada tubo. En esta siembra se empleó agujas estériles, posteriormente los tubos fueron sellados con la tapa rosca y luego cubiertos con parafilm para evitar el ingreso de oxígeno.

3.7.5.3. Siembra en medio King B sólido

Se realizó la siembra en un medio selectivo de este género que cuya característica especial es la fluorescencia de sus colonias. Se preparó el medio de cultivo y se lo esterilizó.

Se plaqueó el medio en cajas Petri y se sembró el inóculo de la bacteria, utilizando la técnica de microgota se colocó desde una altura de 2.5 cm y se dispersó aproximadamente en un área de 1.5 a 2.0 cm de diámetro. Las cajas se dejaron incubando durante un periodo de tiempo de 24 horas y luego se procedió a la visualización de las colonias con características relacionadas según la literatura al del género *Pseudomonas*.

3.7.5.4. Colonias amarillas en medio YDC

Las bacterias fueron sembradas en el medio YDC durante un periodo de 24 horas; las colonias que se tornaron de color crema, fueron expuestas a observaciones a nivel microscópico para corroborar su coloración.

3.7.5.5. Crecimiento en medio D1M Agar

La cepa bacteriana fue sembrada en este medio de cultivo para comprobar si existe crecimiento. Se preparó el medio D1M Agar totalmente esterilizado, luego de aquello se realizó la siembra de las colonias bacterianas y se dejó incubando durante 24 y 48 horas.

3.7.6. Ensayo preliminar

a) Preparación de pre-inóculo en medio King B líquido

En la preparación del pre inóculo se procedió a tomar con una micropipeta de precisión 20 μ L de bacteria, y se procedió a incubar en un matraz erlenmeyer conteniendo 100 ml de medio de cultivo King B líquido, (King *et al.*, 1954) [(g/L): peptona, 20.0; glicerol 15 ml; K_2HPO_4 , 1.5; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1.5; agua destilada (pH 7.2)], esto se incubó en un orbital Shaker Benchmark a 150 rpm durante agitación constante a temperaturas de 25°C por un lapso de 20 horas.

b) Medición de (UFC/ml) en medio de cultivo King B sólido

Se estableció el método de recuento en placa Petri por siembra de gotas en superficie detallado por Sharpe y Kilsby (1971). Para lo cual se preparó una serie gradual de

diluciones, en donde se colocaron cantidades de 900 µL de H₂O estéril y 100 µL del cultivo incubado en tubos eppendorf y se repitió este procedimiento hasta llegar al factor de dilución -6.

Las placas fueron fraccionadas en 6 divisiones enumeradas donde se colocó en cada una las diluciones. Se surtió los 10 µL distribuidos en microgota de cada una de las diluciones en una placa Petri con el medio de cultivo King B sólido. Las placas se dejaron en incubación por 24 horas y se realizó el conteo de colonias de las diluciones que formaron entre 30 y 300 colonias.

Para determinar el número de células viables por ml se usó la siguiente fórmula:

$$UFC/ml = \frac{\text{colonias enumeradas}}{\text{ml sembrado}} * \text{factor de dilución}$$

c) Preparación de placas con medio King B y la aplicación de los agroquímicos

Se preparó medio de cultivo King B sólido, en frascos shock de 100 ml del medio para todos los tratamientos en estudio (Anexo 7). Para cada tratamiento se aplicó distintas dosificaciones de los productos fitosanitarios a evaluar sobre los 100 ml del medio de cultivo.

Luego se realizó la siembra de la bacteria sobre la placa en la cantidad de 10 µL, posteriormente se dispersó por toda la placa con el uso del asa bacteriana para cubrir completamente la superficie de la placa Petri y exista un crecimiento homogéneo de las colonias.

3.7.7. Datos a registrar en la investigación

Los datos que se registraron en el ensayo *in vitro* fueron el crecimiento de colonias en medio de cultivo *Pseudomonas* agar con la aplicación de 5 productos fitosanitarios en dosificaciones alta, media y baja. Para poder determinar su efecto en el crecimiento de las mismas a 24 y 48 horas después de la siembra en las placas petri.

3.8. Recursos humanos y materiales

3.8.1. Recursos humanos

- Docente director del Proyecto de Investigación
- Estudiante responsable de la investigación
- Tutor designado por la empresa

3.8.2. Recursos Materiales

a) Reactivos

- Peptona
- Sulfato de Magnesio
- Agar
- Fosfato dipotasico
- Glicerol
- Timorex Gold
- Primebact plus
- Progranic mega
- Cooper
- Cuprospor

b) Materiales de laboratorio

- Cajas Petri
- Papel toalla
- Matraz erlenmeyer
- Kit de disección básico
- Kit tinción Gram 4x250 ml
- Hipoclorito de sodio al 10%
- Alcohol 70%
- Mecheros
- Puntas amarillas 5-200 uL. Pk/1000

- Puntas azules 1000 uL. Pk/1000
- Microtubos eppendorf 1.5 mL. Pk/1000
- Tubos halcón (10 ml)

c) Equipos de laboratorio

- Balanza analítica de precisión 0.001 g
- Termociclador
- Cabina de flujo
- Shaker Benchmark
- Centrífuga
- Vortex
- Horno Microondas
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Estufa
- Microscopio
- Incubador agitador

3.9. Financiamiento

La presente investigación fue financiada por la empresa Reybanpac, perteneciente al grupo La Favorita C.A.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Aislamiento y purificación del agente causal

En la presente investigación se obtuvo un total de 12 aislamientos bacterianos, los mismos que fueron colectados de los dedos de banano que presentaban la sintomatología de una pudrición suave de color marrón oscuro en la finca María Cristina perteneciente a Reybanpac (Figura 5). En el medio de cultivo King B sólido, se seleccionó las colonias bacterianas en base a su pigmentación (cremas y blancas) y por su forma redonda y completa (Cardoza y Nalimova, 2008).

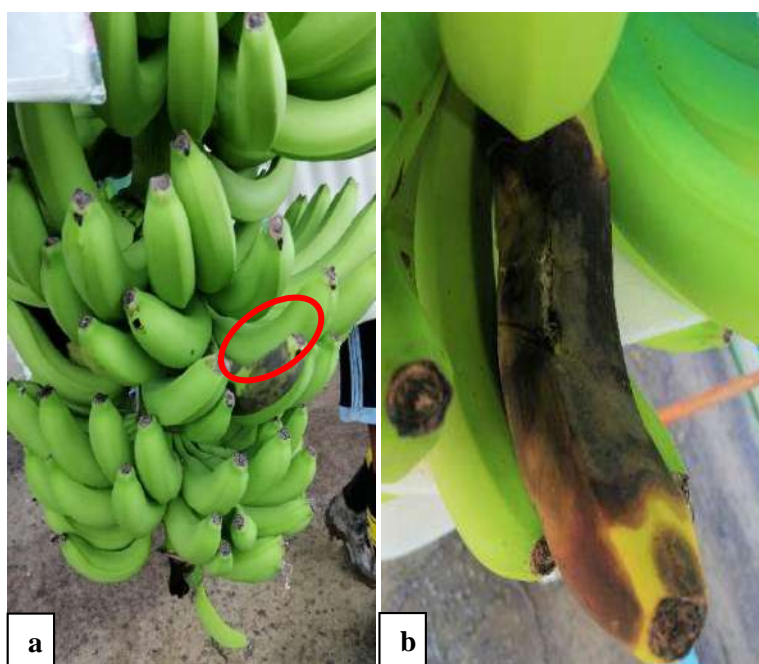


Figura 5: Síntomas observados en banano a nivel de poscosecha. a) Pudrición suave observado en racimos del banano. b) Dedos de banano con síntomas avanzados de la enfermedad.

Para este estudio las colonias con estos tipos de coloración (crema y blanco) fueron seleccionadas como un posible agente causal de la pudrición suave del fruto de banano (Figura 6). Cardoza y Nalimova (2008), mencionan que esta apariencia fenotípica por su coloración crema o blanca de la bacteria podría estar relacionada según la literatura al género *Erwinia*.

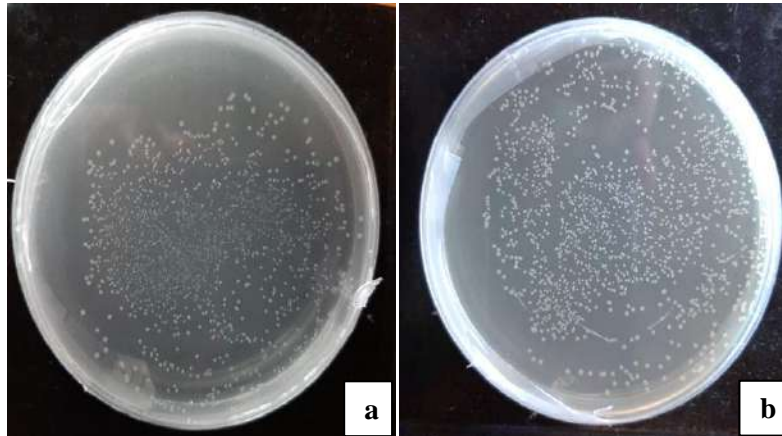


Figura 6: Colonias usadas para la caracterización luego de comprobar su patogenicidad por postulados de Koch.
 a) Colonias con pigmentación crema en medio King B.
 b) Colonias con pigmentación blanca en King B.

4.1.2. Pruebas de patogenicidad

Se efectuó una primera inoculación en condiciones controladas es decir en el laboratorio (Figura 7). Como resultado de esta prueba, se obtuvo síntomas en los dedos de banano nueve días después de haber sido inoculado en donde presentó los mismos síntomas (lesiones de color marrón sobre de la fruta) de igual modo que se encontró en campo.

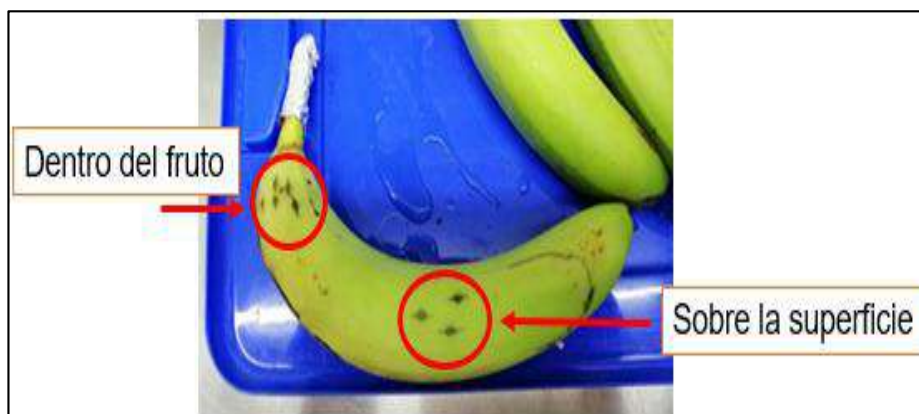


Figura 7: Inoculación del dedo de banano en condiciones de laboratorio.

Se obtuvieron características muy similares como lo es la mancha de color café claro u oscuro que va progresando en la fruta y que afecta la calidad de la misma, también se pudo observar claramente que la fruta tiene una maduración acelerada a comparación del

control (Figura 8). Como última sintomatología se puede evidenciar con exactitud la descomposición de la fruta de banano en la parte superior por causa de la maduración acelerada del mismo.

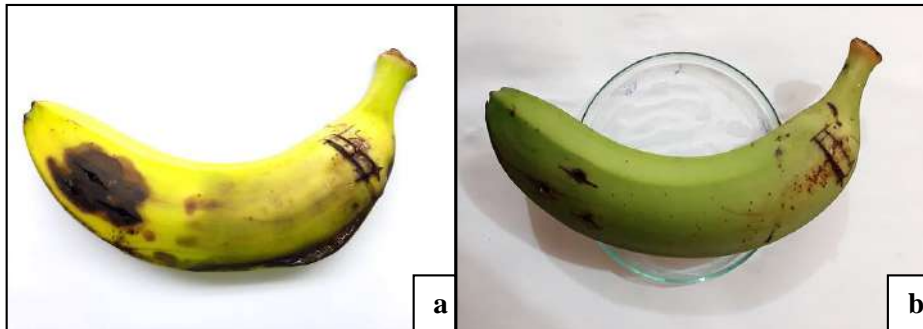


Figura 8: Síntomas presentados luego de la inoculación de los dedos de banano con la bacteria aislada. a) Fruto de banano inoculado a los 9 días. b) Fruto de banano control.

Para corroborar los ensayos realizados en el laboratorio se siguió la metodología (Lee *et al.*, 2003) para aplicarla en campo ya con condiciones netamente climáticas (Figura 9). A los 15 días después de las inoculaciones se observaron frutos con síntomas similares, pero solamente dos cepas de las 12 inoculadas causaron este tipo de sintomatología.

Como resultado de este ensayo en campo, dos cepas bacterianas manifestaron la misma sintomatología que se observó en campo desde un inicio y las que se pudieron manifestar en laboratorio.



Figura 9: Sitios de inoculación bacteriana en plantas de banano de dos semanas de fructificación. a) Inoculación sobre la superficie de la fruta. b) Inoculación dentro del estigma de la flor.

4.1.3. Caracterización por descarte de medios

Al momento de efectuar la caracterización por descartes de medios descrita por Schaad *et al.*, (2001) en condiciones controladas (laboratorio) se lograron obtener los siguientes resultados por cada ensayo realizado.

4.1.3.1. Tinción de gram

Como primera prueba de caracterización se efectuó la tinción de gram, esta prueba nos permitió un diagnóstico rápido sobre qué tipo de bacteria estábamos trabajando, en este caso la tinción que se obtuvo de la bacteria fue rosado lo que significa que se obtuvo una bacteria gram negativa (-) (Figura 10).

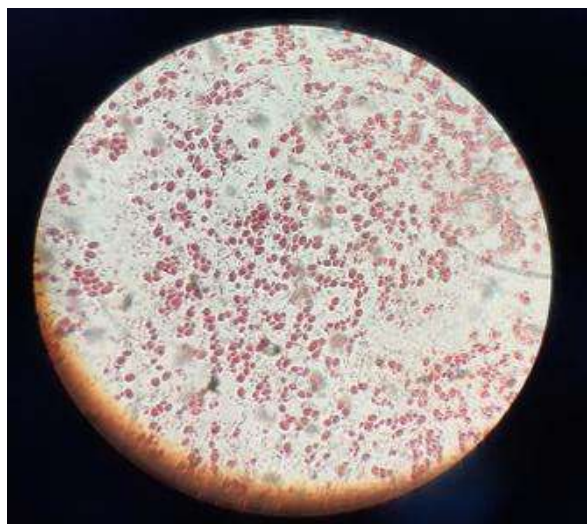


Figura 10: Tinción de Gram en la bacteria aislada. Color rosado muestra una tinción Gram negativa (-).

4.1.3.2. Prueba de anaerobiosis

Luego de realizar la prueba de anaerobiosis, se comprobó que no existe un crecimiento de colonias bacterianas, por lo tanto, la prueba resultó negativa, indicando que pudo existir el desarrollo de los géneros *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* o *Xanthomonas* que no tienen un crecimiento en este tipo de test (Figura 11).



Figura 11: Prueba de anaerobiosis en cultivo King B. La ausencia de crecimiento bacteriano muestra una reacción negativa.

4.1.3.3. Colonias fluorescentes en medio King B

Al realizar el test del crecimiento de colonias fluorescentes en el medio de cultivo King B, en el cual dio como efecto un crecimiento de colonias del mismo color característico de la bacteria aislada inicialmente (Figura 12). El resultado de esta prueba dio como negativa, indicando que cada vez existe menos cantidad de géneros como: *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Pantoea*, *Burkholderia* y *Erwinia* o *Dickeya*.

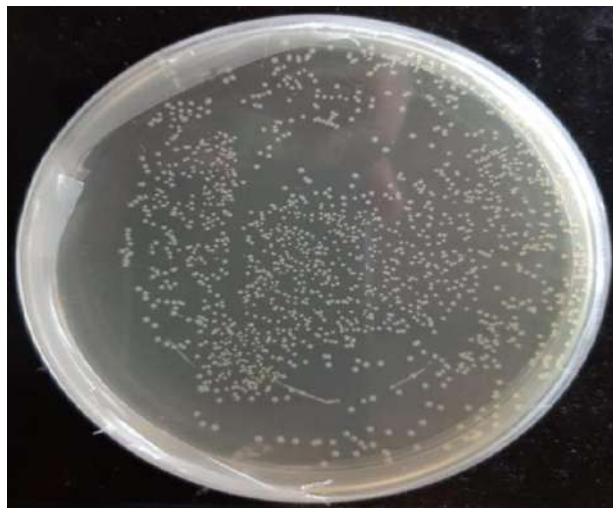


Figura 12: Crecimiento bacteriano en medio King B presentando una tonalidad crema indicando negativo para *Pseudomonas*

4.1.3.4. Colonias amarillas en YDC

Como resultado de este test, se probó si existía un crecimiento de colonias amarillas en YDC que es un medio selectivo para bacterias del género *Xanthomonas*, en este caso el test dio como resultado negativo ya que existe un crecimiento de la bacteria de color blanco y no de coloración amarilla (Figura 13).



Figura 13: Crecimiento bacteriano en medio YDC con una tonalidad blanquecina indicando negativo para *Xanthomonas*.

4.1.3.5. Crecimiento en D1M agar

Como última prueba se preparó un medio de cultivo D1M agar que es un medio de cultivo selectivo del género *Agrobacterium*, no existiendo un crecimiento de la colonia dando como resultado negativo este tipo de prueba.

Luego de este ensayo se obtuvo como consecuencia la obtención de dos géneros como es *Erwinia* o *Burkholderia*. Basado en la revisión de bibliografía reportada previamente por Martínez *et al.*, (2013), se puede asumir con mucha exactitud que el género de bacteria aislado es *Erwinia* previamente conocido como *Dickeya*.

En la Figura 14, se muestra un esquema como resultado final al efectuar la caracterización por descarte de medios en condiciones de laboratorio.

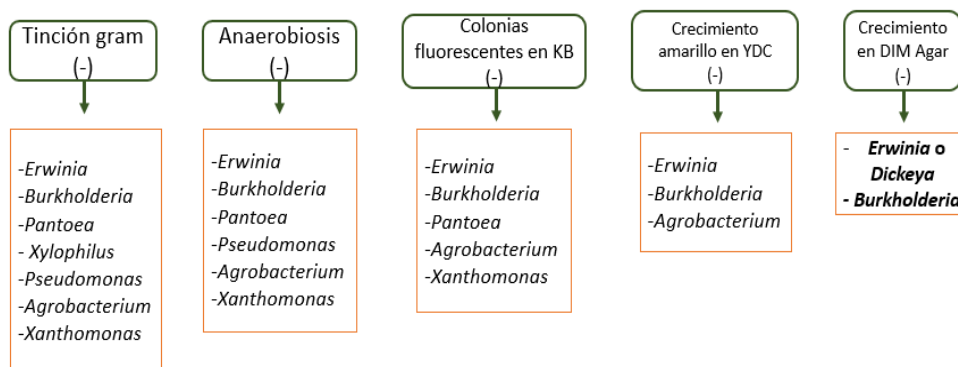


Figura 14: Caracterización a nivel de género por descarte de medios bacterianos.

4.1.4. Efecto *in vitro* de los agroquímicos sobre el crecimiento de colonias del agente causal

4.1.4.1. Determinación de UFC en el tratamiento TIMOREX Gold en diferentes dosificaciones a las 18, 24 y 48 horas

Mediante el análisis de varianza se pudo estimar que la aplicación de Timorex Gold en dosificaciones media (T1) y alta (T2) permitió obtener un menor número de UFC, difiriendo estadísticamente a la dosis baja (T3) y al control (T16) que presentaron un mayor número de UFC a las 18, 24 y 48 horas respectivamente (Figura 15).

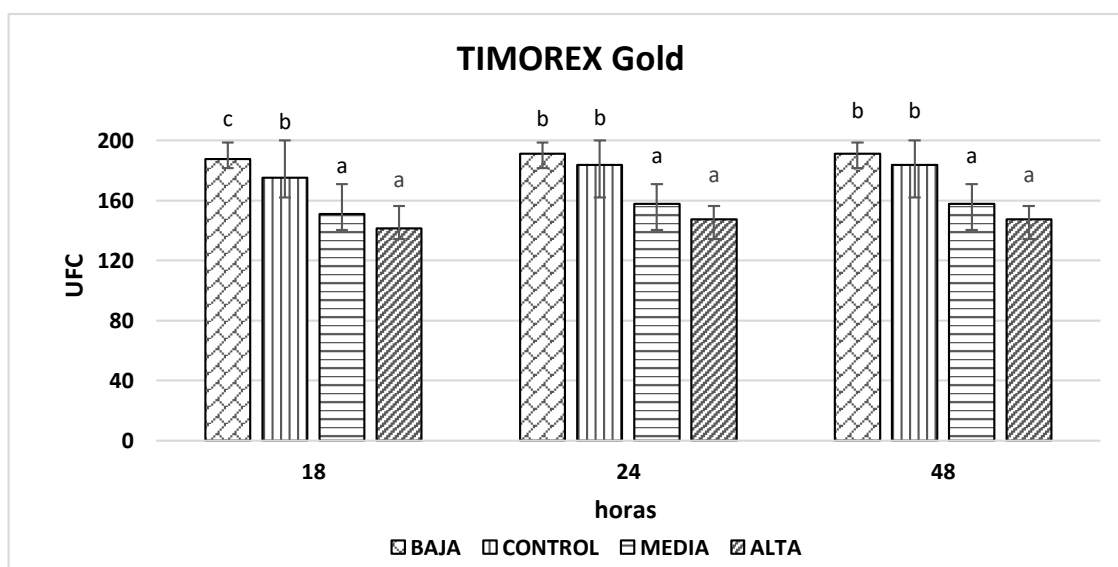


Figura 15: Número de (UFC) en el tratamiento TIMOREX Gold en diferentes dosis a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Las barras representan desviación estándar.

4.1.4.2. Determinación de UFC en el tratamiento PROGANIC Mega en diferentes dosificaciones a las 18, 24 y 48 horas

Mediante el análisis de varianza se pudo estimar que la aplicación de PROGANIC Mega en dosis altas (T6) permitió alcanzar un número menor de UFC, difiriendo estadísticamente a la dosis baja (T4), media (T5) y control (T16) que presentó un mayor número de UFC a las 18, 24 y 48 horas (Figura 16).

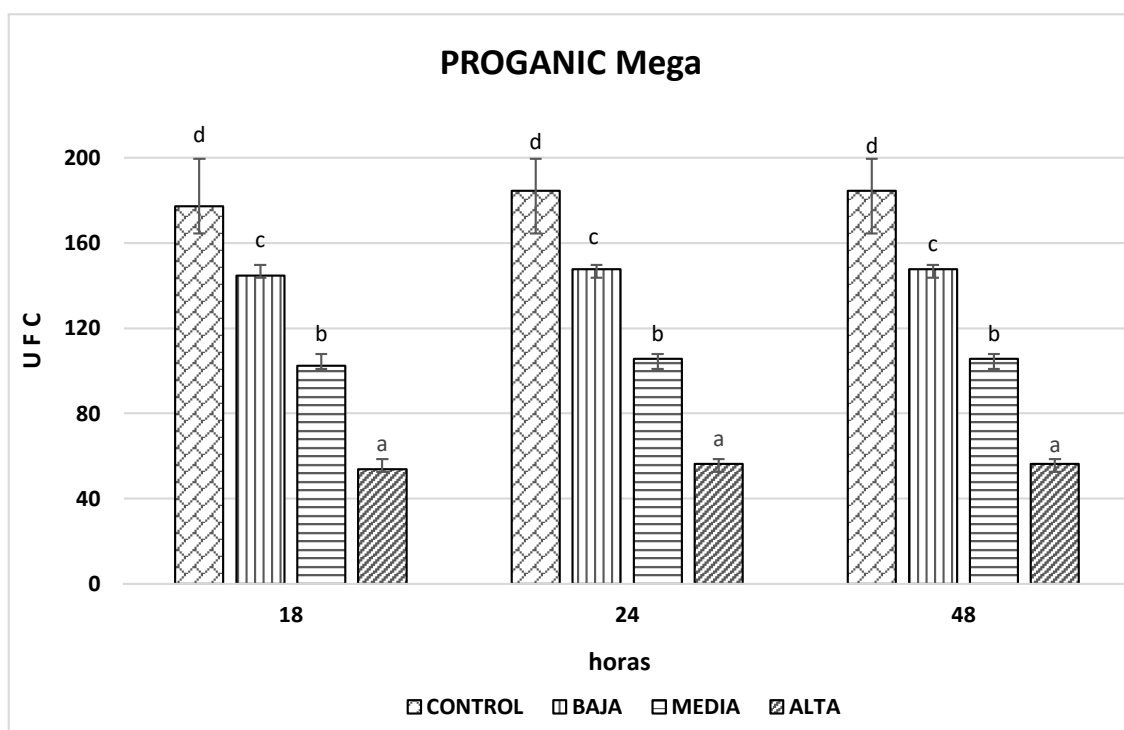


Figura 16: Número de (UFC) en el tratamiento PROGANIC Mega en diferentes dosis a las 18, 24 y 48 horas respectivamente.

4.1.4.3. Determinación de UFC en el tratamiento PRIMEBACT Plus en diferentes dosificaciones a las 18, 24 y 48 horas

Mediante el análisis de varianza se pudo evaluar que la aplicación de PRIMEBACT Plus en dosis alta (T9) permitió alcanzar un número menor de UFC, siendo el tratamiento que mayor efecto de inhibición bacteriano en placas Petri a comparación a la demás dosis baja (T7), media (T8) y al control (T16) que presentaron un mayor número de UFC a las 18, 24 y 48 horas (Figura 17).

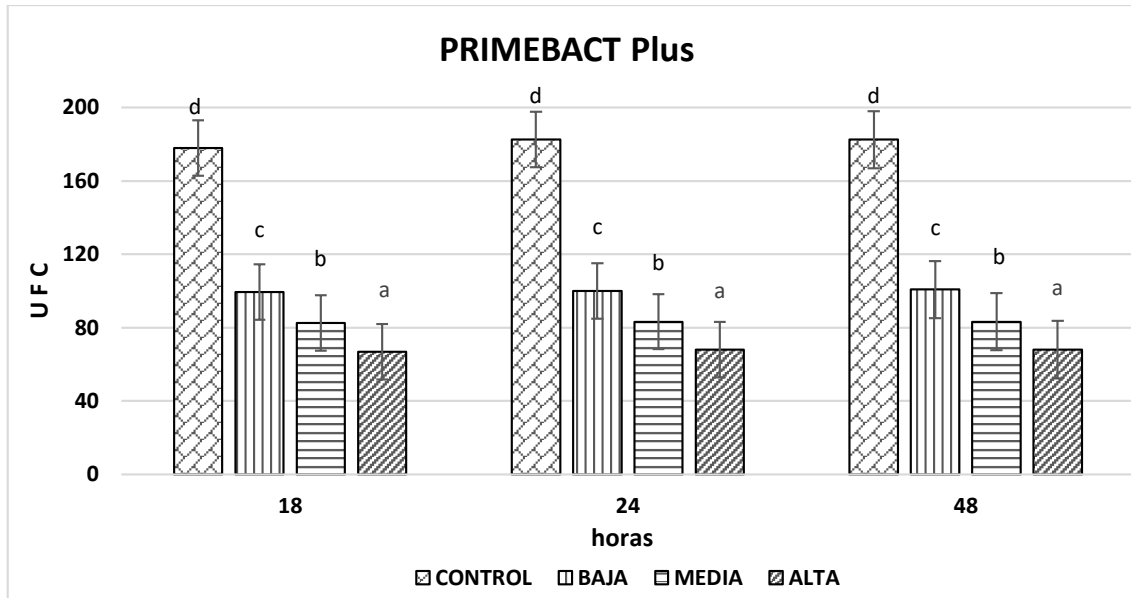


Figura 17: Número de (UFC) en el tratamiento PRIMEBACT Plus en diferentes dosis a las 18, 24 y 48 horas respectivamente.

4.1.4.4. Determinación de UFC en el tratamiento CUPROSPOR en diferentes dosificaciones a las 18, 24 y 48 horas

Mediante el análisis de varianza se pudo estimar que la aplicación de CUPROSPOR en dosis alta (T12) permitió alcanzar un número menor de UFC, siendo más eficaz a las demás dosificaciones baja (T10), media (T11) y control (T16) que presentaron un mayor número de UFC a las 18, 24 y 48 horas respectivamente (Figura 18).

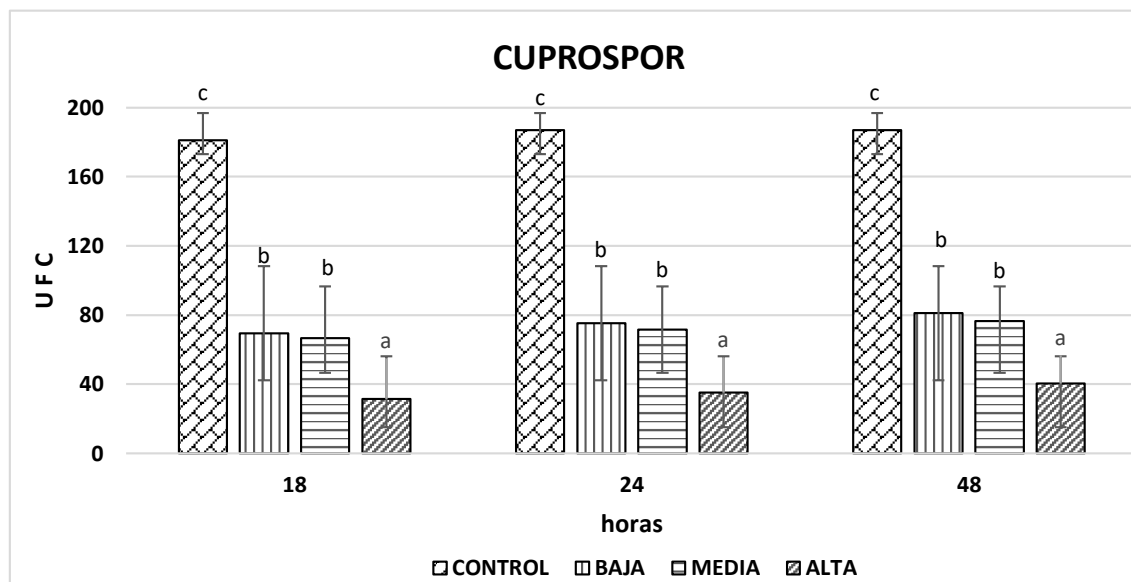


Figura 18: Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en el tratamiento CUPROSPOR en diferentes dosificaciones a las 18, 24 y 48 horas respectivamente.

4.1.4.5. Determinación de UFC en el tratamiento COOPER en diferentes dosificaciones a las 18, 24 y 48 horas

En el análisis de varianza se efectuó mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$), utilizado para evaluar el número de unidades formadoras de colonias. En la Figura 19, se presentan el número de UFC por tratamiento a las 18, 24 y 48 horas respectivamente.

De acuerdo al análisis de varianza se pudo estimar que la aplicación del producto COOPER en dosis alta (T15) permitió alcanzar un número menor de UFC, teniendo un efecto inhibitorio superior a la demás dosis baja (T13), media (T14) y control (T16) que demuestran un mayor número de UFC a las 18, 24 y 48 horas.

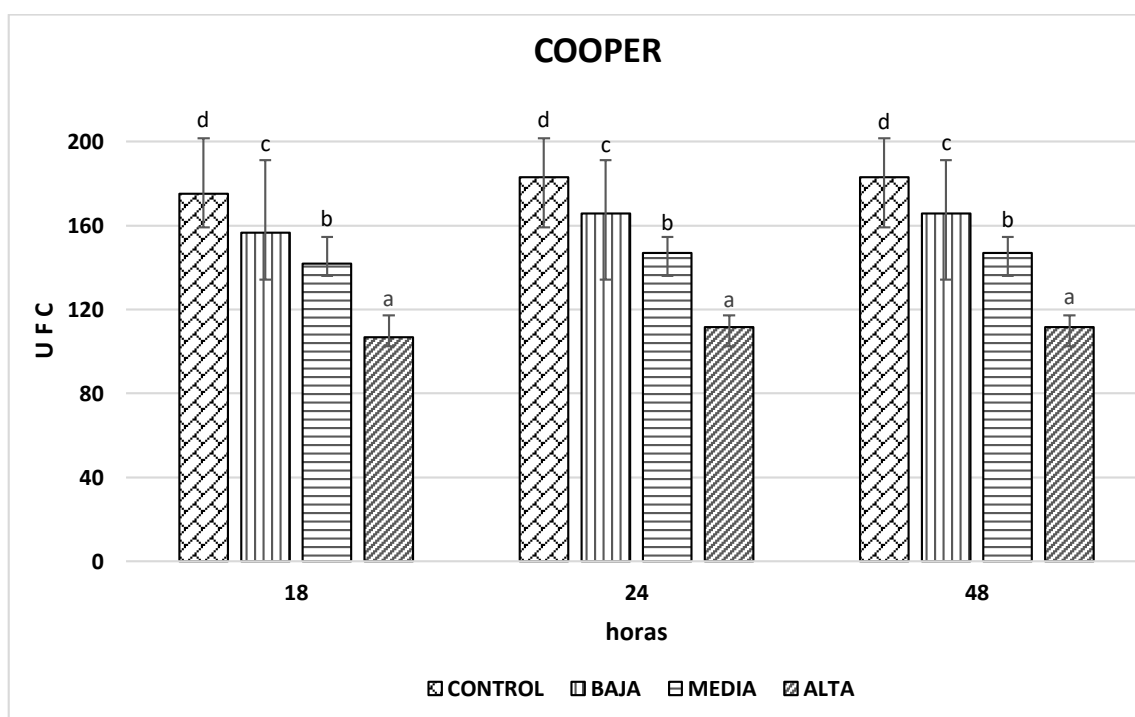


Figura 19: Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en el tratamiento COOPER en diferentes dosificaciones a las 18, 24 y 48 horas.

4.1.4.6. Análisis de los tratamientos versus las dosificaciones

En la Figura 20, se presentan las medias de cada tratamiento al haber finalizado el conteo de UFC a las 48 horas después de haber realizado la siembra a nivel *in vitro* respectivamente.

Efectuado el análisis de varianza los tratamientos T12 y T6 presentaron alta significancia estadística con relación a los demás tratamientos. La aplicación de CUPROSPOR en dosis alta proporcionó un bajo crecimiento de colonias con un promedio de 40.5 UFC, mientras que la aplicación del producto PROGANIC Mega en dosis baja permitió el crecimiento promedio de 56.3 UFC. Teniendo un efecto inhibitorio superior a los demás tratamientos que presentaron promedios de 68.0 hasta 191.25 UFC.

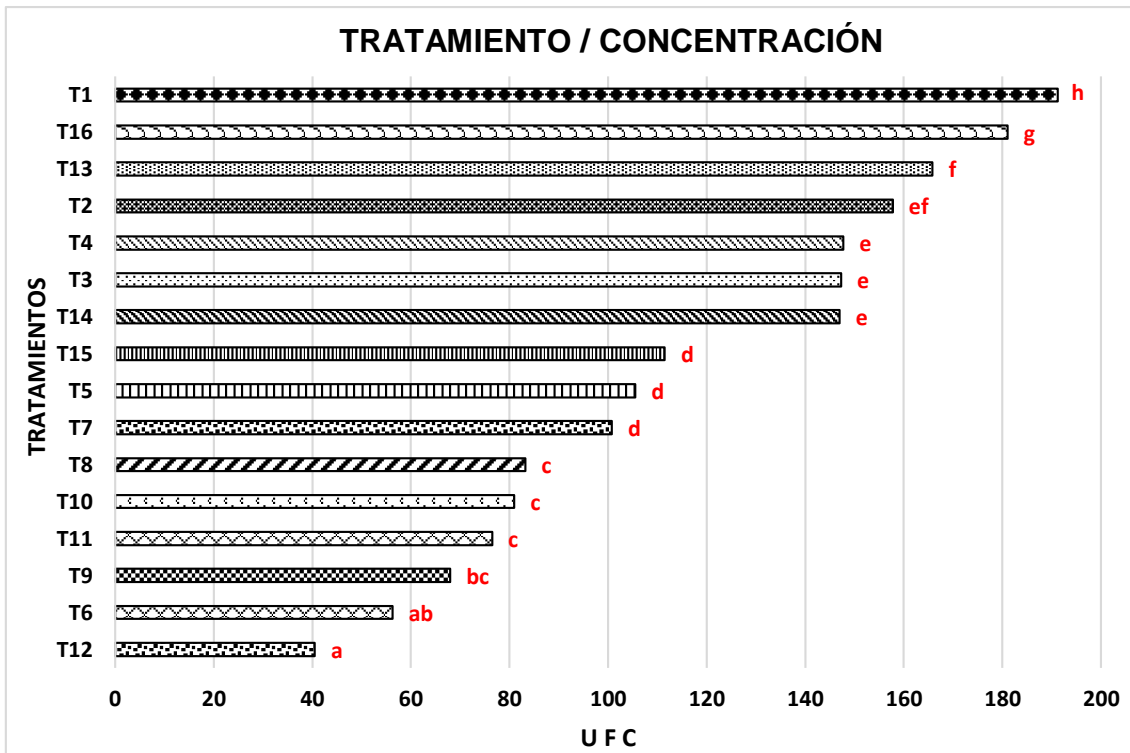


Figura 20: Análisis de los tratamientos evaluados frente las dosificaciones después de las 48 horas del conteo de UFC.

4.2. Discusión

Los síntomas que fueron encontrados en frutos de banano como la pudrición blanda de color marrón en la finca “María Cristina” son similares a los que se manifiestan en estudios de patogenicidad realizados por otros autores en Colombia (Martínez *et al.*, 2013), según los autores mencionados anteriormente los síntomas de pudrición suave del dedo de banano son ocasionados por *Erwinia carotovora*. De igual manera, manifiestan que la primera evidencia externa de que un dedo de banano está infectado por la pudrición suave es la aparición de una pequeña área (6-8 mm de diámetro) de la cáscara con apariencia húmeda o grasosa, generalmente cercana a la punta del dedo. Por lo que en este estudio sugerimos que la presencia del dedo pudre en cultivos de banano se trata al menos del mismo género de bacteria *Erwinia*.

La infección de *Erwinia* infecta el fruto en las dos primeras semanas de su desarrollo, por medio de heridas producidas en su extremo (punta) debido al desprendimiento natural de sus partes florales, o por labores como la desflora en el campo (Martínez *et al.*, 2013). En la presente investigación fue posible observar que la inoculación realizada en la zona del estigma floral del fruto la enfermedad progresó con más severidad en los dedos de banano por lo que se corrobora que es una vía de ingreso del agente causal.

Al momento de realizar la caracterización por descarte de medios se recurrieron a distintos test para llegar de lo más general a algo más específico a nivel de género de bacterias (Schaad *et al.*, 2001). En la tinción de gram se la bacteria a identificar se tiñó de color rosado lo que significó que es una bacteria gram negativa. De igual manera se sembró en medio de cultivo King B que es un medio para medir florescencias de las colonias que se sembraron en placas Petri con condiciones de laboratorio.

Además se procedió con la elaboración del medio YDC que es un medio selectivo para la identificación de bacterias del género de las *Xantomonas* como lo describe (Gilchrist, 2005); este medio de cultivo las colonias perteneciente a este género se tornan de color amarillas, lo que permitió la comparación con la bacteria sembrada que tuvo una coloración blanco tiza diferentes a las colonias del de la *Xantomonas*, dando como resultado el descarte de este tipo de género.

Para finalizar se preparó un medio D1M agar que permite favorece el crecimiento de bacterias del género *Agrobacterium* así lo indica Braga (2015) pero al momento de la visualización de la siembra realizada con la bacteria aislada no existió crecimiento de la colonia solamente de contaminantes no relacionados con el agente causal.

Los resultados reflejaron que la aplicación de CUPROSPOR en dosis alta produjo menor cantidad de (UFC) a las 48 horas después de la siembra a nivel *in vitro* siendo el tratamiento con más efectividad la inhibición del crecimiento de las colonias, lo que concuerda con Hernández (2006), quien sostiene que el efecto de su ingrediente activo como lo es el sulfato de cobre es un altísimo bactericida de alto espectro que estimula y promueve a la planta una acción de autodefensa frente a organismos patógenos como las bacterias del género *Erwinia*.

De igual forma los resultados obtenidos con la aplicación del producto PROGRANIC Mega en dosificaciones alta redujo significativamente el crecimiento de (UFC). Este producto posee propiedades biológicas con acción bactericida. El modo de acción que posee se debe a los compuestos fenólicos que lo conforman los cuales reaccionan químicamente con los sistemas sensitivos de las enzimas y las vuelve catalíticamente inactivas (Moreno *et al.*, 2011). Las aplicaciones del producto PROGRANIC Mega a base de gobernadora (*Larrea tridentata*) ha probado tener efectos bactericidas y bacteriostáticos a bajas dosis, como lo demuestra el trabajo de (Velásquez, 1983) al evaluar *in vitro* diversas dosis del extracto de *Larrea tridentata* contra las bacterias fitopatógenas del género *Erwinia* inhibiendo su crecimiento en placas Petri.

Finalmente, con el conocimiento del agente patógeno causante del dedo pudre que pertenece a la bacteria del género *Erwinia*, podemos crear estrategias de control y establecer prácticas que certifiquen la inocuidad del producto final para beneficio de muchos productores que presenten esta problemática en campo. Además, se demostró que la utilización del producto fitosanitario CUPROSPOR tiene un mayor efecto frente al crecimiento de UFC a nivel *in vitro*, resultando ser una herramienta eficiente para el control de esta enfermedad en condiciones de laboratorio.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Mediante la prueba de caracterización por descarte de medios permitieron identificar eficientemente el patógeno que ocasiona la enfermedad “dedo pudre”, resultando ser una bacteria perteneciente al género *Erwinia*.
- Todos los aislamientos utilizados en las pruebas de patogenicidad en laboratorio no fueron capaces de infectar los dedos de banano, solo dos de las doce cepas aisladas manifestaron la misma sintomatología en campo.
- La aplicación del producto CUPROSPOR en dosis alta (0.50 ml) y PROGRANIC Mega (1.0 ml) resultaron ser más eficientes al momento de evaluar el crecimiento de unidades formadoras de colonias con un crecimiento promedio de 40.5 y 56.3 (UFC) a las 48 horas, en comparación al control.
- El uso de los productos: CUPROSPOR (producto fitosanitario sintético) y PROGRANIC Mega (producto fitosanitario orgánico) inhiben el crecimiento de unidades formadoras de colonias de *Erwinia* en condiciones de laboratorio.

5.2. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de CUPROSPOR y PROGRANIC Mega en dosis medias y altas en plantaciones establecidas de banano en frutos con sintomatología de *Erwinia*.
- Efectuar investigaciones con otros productos biológicos que tengan propiedades bactericidas para el control del agente causal y que aporten en beneficio a las buenas prácticas agrícolas.
- Se recomienda la remoción de racimos de banano que presenten frutos con síntomas del dedo pudre siendo un foco de infección al momento de cosechar y ser exportada la fruta.
- Se recomienda la aplicación en dosis media y alta del producto fitosanitario PROGRANIC Mega después de realizar el desflore que es considerada una vía de ingreso de la enfermedad.
- Finalmente se debe realizar ensayos moleculares como la ampliación de PCR y la secuenciación, para confirmar la especie del agente patogénico que ocasiona la pudrición en dedos de banano.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. (2005). Introduction to plant pathology. . Elsevier Academic Press Publication.

Alonso, K. (2014). FMC Agricultural Solutions. Obtenido de <https://fmcagro.es/producto/100/copper-sup-sup-435>

Braga, L. (2015). Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* y la influencia de su inoculación sobre la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa.

Cepeda, D. (2011). Cuando las manos hacen el racimo: Condiciones de producción y trabajo del banano en Ecuador. Agroindustria y Soberanía Alimentaria Hacia una Ley de Agroindustria y Empleo Agrícola, 85-94 p.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., y Robledo C.W. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

ESPAC. (2019). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. Obtenido de https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac2019/Presentacion%20de%20los%20principales%20resultados%20ESPAC%202019.pdf

Fabra, N. (2015). Causas de pérdidas que se producen en la post cosecha de banano en la zona de Quevedo. 50 p.

Febeabio. (2015). Febeabio - PRORGANIC Mega. Obtenido de <http://febeabio.com/catalogo/productos-organicos/progranico-mega/>

Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2009). Diagnóstico microbiológico, 12° ed. Medica panamericana. 1160 p. Argentina.

- Fuentes, L., Dominguez, A., y Alema, S. (2007). El estrés oxidativo en las plantas. Causas, efectos y mecanismos de defensa antioxidante. Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas. Cuba.
- Gilchrist, L. .. (2005). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Mexico: CIMMYT.
- Hernández, F. (2016). Eficacia del control químico preventivo de *Erwinia carotovora* en maíz. Chile.
- INEC. (2018). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continúa. Obtenido de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web_inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac%202013/InformeEjecutivoESPAC2013.
- INFOAGRO. (2015). El cultivo trópico de banano. Disponible en https://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/banano.html
- INIAP. (2010). Banano plátano y otras musáceas. Recuperado el: 01 de abril del 2017. Ecuador.
- Jurado, H. (2005). Procedimientos de identificación bacteriana. Sistemas manuales y automáticos. Últimas tendencias en identificación. Madrid.
- La Scola, B., Khelaifia, S., Lagier, J. C., y Raoult, D. (2014). Aerobic culture of anaerobic bacteria using antioxidants: a preliminary report. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 1781-1783.
- Lee, Y., Shiao, Y., y Chao, C. (2003). Primer informe de *Burkholderia cepacia* como patógeno de la pudrición de la punta del dedo del plátano en Taiwán. *Enfermedad vegetal* . APS Publications, 601-610.
- León, M. (2007). Control de plagas y enfermedades en los cultivos, enfermedades del tallo y del pseudotallo. 208-210-213 p.

- Manzano, A. (2013). Identificación de los causales de enfermedades bacterianas en banano (*Musa aaa*) en zonas productoras seleccionadas del Ecuador. Guayaquil.
- Martínez, I., Villalta, R., Soto, E., Murillo, G., & Guzmán, M. (2011). Proyecto demostrativo con implementación de BPA en el cultivo del banano. Corporación Bananera Nacional, Dirección de Investigaciones Sección de Fitopatología. Costa Rica: CORBANA. Recuperado de <http://www.infoagro.net/programas/ambiente/pages/adaptacion/casos/Sigatoka.pdf>.
- Pacheco, R. (2014). Tesis de grado: identificación de genes expresados en plantas de banano efecto DE inoculación con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Guayaquil, Ecuador: CIBE Espol.
- Ploetz, R. C. (2003). Diseases of Tropical Fruit Crops. USA: CABI.
- Prescott, L., Harley, J., & Lein, D. (1997). Microbiología. España: McGraw-Hill.
- PROEcuador. (2017). Análisis sectorial Banana 2016. Recuperado de: www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/PROEC-AS2016-Banano.pdf.
- Ruiz, P. (2012). Informe de pasantías realizadas en la hacienda "Bellavista". Guayaquil, Ecuador.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).
- Sharpe, A. N., & Kilsby, D. C. (1971). A rapid, inexpensive bacterial count technique using agar droplets. 34:435-440 p.
- Snehalatharani, A., & Khan, A. N. (2010). Biochemical and physiological characterisation of *Erwinia* species causing tip-over disease of banana. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, 43(11), 1072-1080.

Soto, M. (2002). Bananos cultivo y comercialización (Vol. 2). San José, Costa Rica: Litografía e Imprenta LIL.

Syngenta. (2019). Syngenta Global - Timorex Gold®. Obtenido de <https://www.syngenta.cl/product/crop-protection/fungicidas/timorex-goldr-1>

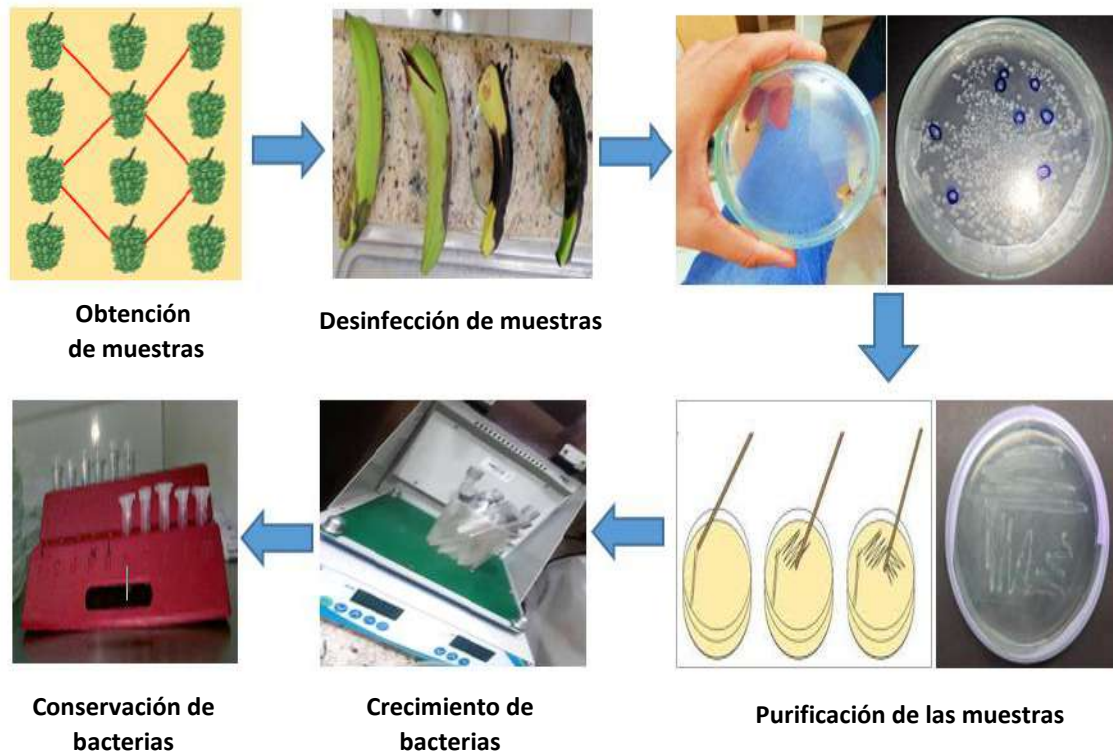
Volcy, C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología 107- 115 p.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1. Anexos

Anexo 1: Proceso para la obtención de aislados bacterianos obtenidos de los dedos de banano con sintomatología al dedo pudre.



Anexo 2: Inoculaciones a dedos de banano con las cepas bacterianas aisladas en condiciones de laboratorio.



Anexo 3: Inoculación en condiciones de campo de las doce cepas bacterianas aisladas previamente en laboratorio.

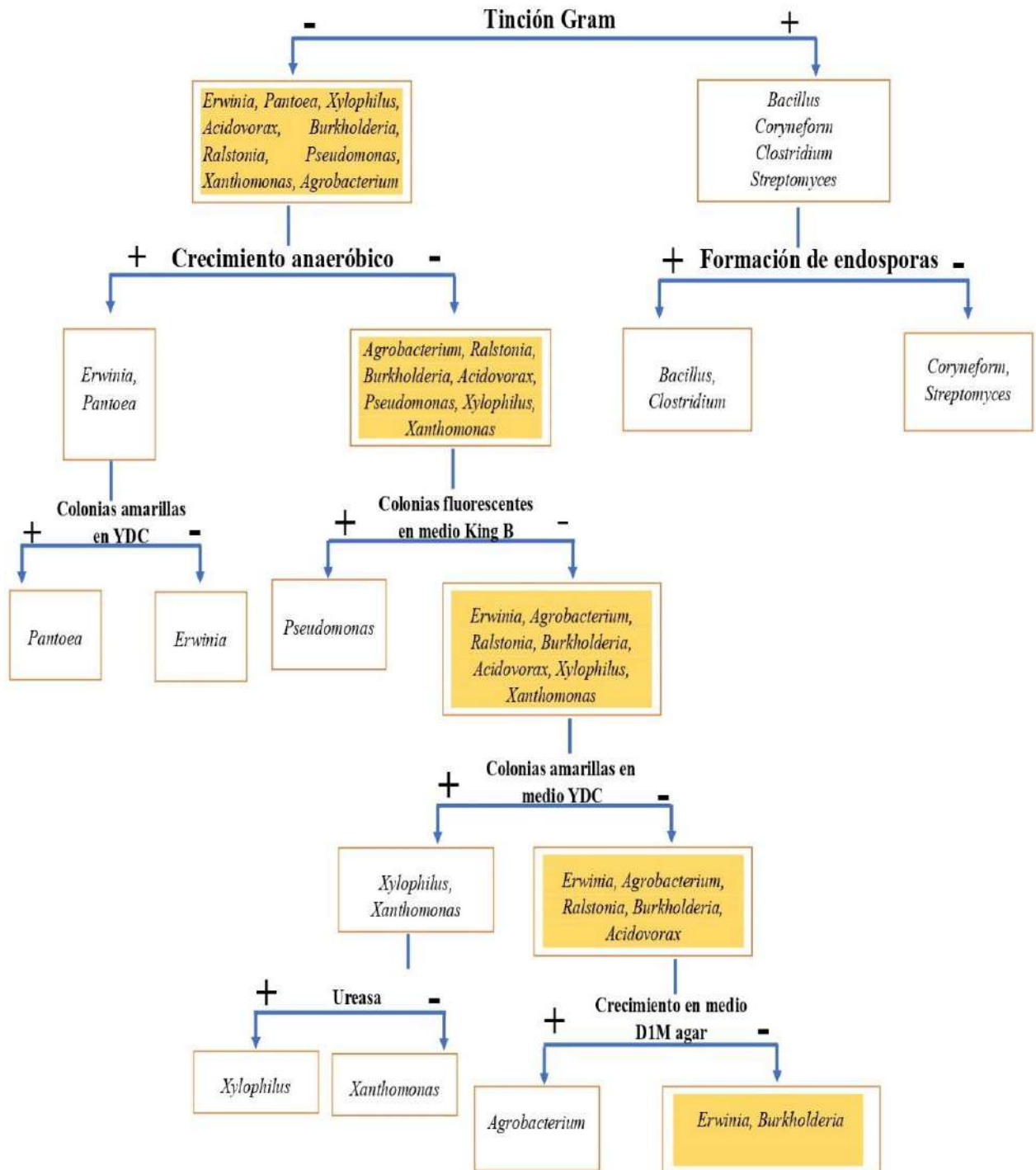


Anexo 4: Recuperación de dos cepas patógenas que causaron los mismos síntomas de la enfermedad en campo.



Anexo 5: Metodología empleada para la caracterización del agente causal por descarte de medios.

Caracterización por descarte de medios



Fuente: (Schaad *et al.*, 2001).

Anexo 6: Pruebas de caracterización realizadas para identificación del género.

				
Tinción (-)	Anaerobiosis (-)	Pigmento fluorescentes en KB (-)	Crecimiento amarillo en YDC (-)	Crecimiento en DIM Agar (-)
- <i>Erwinia</i> - <i>Burkholderia</i> - <i>Pantoea</i> - <i>Xylophilus</i> - <i>Pseudomonas</i> - <i>Agrobacterium</i> - <i>Xanthomonas</i>	- <i>Erwinia</i> - <i>Burkholderia</i> - <i>Pantoea</i> - <i>Pseudomonas</i> - <i>Agrobacterium</i> - <i>Xanthomonas</i>	- <i>Erwinia</i> - <i>Burkholderia</i> - <i>Pantoea</i> - <i>Agrobacterium</i> - <i>Xanthomonas</i>	- <i>Erwinia</i> - <i>Burkholderia</i> - <i>Agrobacterium</i>	- <i>Erwinia</i> o <i>Dickeya</i> - <i>Burkholderia</i>

Anexo 7: Dosis e ingrediente activo de los tratamientos evaluados a nivel in vitro

Tratamientos	Ingrediente activo	Modo de acción	Dosis de aplicación
1 TIMOREX GOLD	Aceite de árbol de té (222,5 g/L)	Fungicida preventivo	1.0 – 2.0 L/ha
2 MEGA	Extracto de gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>) (768.55 g/L)	Fungicida y bactericida botánico	1.0 – 2.0 L/ha
3 PRIMEBACT PLUS	Sales de Amonio 20% Calcantita (Sulfato pentahidratado) 25%	Fungicida y generador de inmunidad a la planta	0.20 – 0.50 L/ha
4 CUPROSPOR	Sulfato cúprico pentahidratado (270.0 g/L)	Fungicida- Bactericida de contacto preventivo	0.5 – 1.0 L/ha
5 COPPER	Cobre soluble 5% p/p	Se usa como fuente de cobre para potenciar la fotosíntesis	1.0 – 1.5 L/ha

Tratamientos	Dosificaciones L/Ha			100 ml de medio de cultivo		
	Baja	Media	Alta	Baja (ml)	Media (ml)	Alta (ml)
1 Timorex Gold (T)	1.0	1.5	2.0	0.50	0.75	1.0
2 Mega (M)	1.0	1.5	2.0	0.50	0.75	1.0
3 Primerbact plus (P)	0.20	0.35	0.50	0.10	0.18	0.25
4 Cuprospor (S)	0.5	0.75	1.0	0.25	0.38	0.50
5 Copper (C)	1.0	1.25	1.5	0.50	0.63	0,75