



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE AGRONOMÍA (REDISEÑO)

Proyecto de investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniero Agrónomo.

Título del Proyecto de Investigación:

“Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Mal de Panamá) y su antagonismo contra PGPR’s en condiciones *in vitro*”.

Autor:

Victor Alexi Tubay Muñoz

Director del Proyecto de Investigación:

Hayron Fabricio Canchignia Martínez, PhD

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2021

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Victor Alexi Tubay Muñoz**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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

Victor Alexi Tubay Muñoz

AUTOR

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Hayron Fabricio Canchignia Martínez**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el egresado **Victor Alexi Tubay Muñoz**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, “**Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Mal de Panamá) y su antagonismo contra PGPR’s en condiciones *in vitro*”**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Hayron Fabricio Canchignia Martínez, PhD
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

CERTIFICACIÓN

El suscrito **Hayron Fabricio Canchignia Martínez**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado “**Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 1 (Mal de Panamá) y su antagonismo contra PGPR’s en condiciones *in vitro*”**, de autoría del estudiante **TUBAY MUÑOZ VICTOR ALEXI** de la carrera de Agronomía (Rediseño).

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 8%.



Document Information

Analyzed document	TESIS VICTOR TUBAY final HFCM 29-7-21 URKUND.docx (D110937080)
Submitted	8/2/2021 2:42:00 PM
Submitted by	
Submitter email	hcanchignia@uteq.edu.ec
Similarity	8%
Analysis address	hcanchignia.uteq@analysis.urkund.com

Hayron Fabricio Canchignia Martínez, PhD
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMÍA (REDISEÑO)

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Mal de Panamá) y su antagonismo contra PGPR´s en condiciones *in vitro*”

Presentado al Consejo Académico como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO.

Autor:

Victor Alexi Tubay Muñoz

Aprobado por:

Fernando Abasolo Pacheco, PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Favio Herrera Eguez, PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Raquel Guerrero Chuez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR

2021

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación es fruto del esfuerzo y dedicación, es por ello que quisiera extender mis sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones, las cuales estuvieron siempre apoyándome y brindándome las motivaciones necesarias:

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, que me abrió sus puertas para pertenecer a esta gran familia de Agrónomos.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, la cual me acogió durante todo el proceso de mi formación académica y donde conocí a compañeros y futuros colegas que llevaré en mi corazón y a los cuales también agradezco por su amistad. A Ivonne Varas, mi gran amiga, a Yulissa Pazmiño y Jean Baidal, personas que estimo mucho

A los docentes de la FCA, quienes me brindaron sus conocimientos para crecer en mi vida académica y profesional.

Al M.Sc. Antonio Mendoza, responsable del área de laboratorio de biotecnología, quien me brindó su ayuda incondicional en el desarrollo del trabajo investigativo.

A los ingenieros agrónomos Ángel Cedeño y Luis Vera, a los también futuros colegas Cristhian Macías, Jorge García, quienes me brindaron su amistad sincera y estuvieron prestos a compartir sus conocimientos conmigo, aconsejarme en cualquier duda que tenía.

Finalmente, mis sinceros agradecimientos a mi director de tesis, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez, por ser el guía durante todo este proceso, por apoyarme brindándome sus conocimientos.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación va dedicado a la memoria de mi padre Victor, quien fue una guía en mi vida, también va dedicado a mi madre María, una mamá guerrera quien me brindó todo su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, no me alcanzará la vida para agradecerle todo su esfuerzo a través de estos años.

También quiero dedicar este trabajo a una persona muy especial, a mi novia, la srta. Mayi Valdez, quien estuvo incondicionalmente cuando lo necesité y gracias a ella pude salir adelante, brindándome la luz necesaria para retomar mi camino y plantear nuevas metas.

RESUMEN

El cultivo de banano es de importancia económica para muchos países. Sin embargo, enfermedades como el mal de Panamá amenazan su productividad, siendo el uso de PGPR's (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) una alternativa para su control. El objetivo de esta investigación fue de identificar *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (FOCR1) y su antagonismo contra PGPR's en condiciones *in vitro*. Se localizaron plantaciones de banano Gros Michel en distintas zonas de las provincias del Guayas y Los Ríos, se tomaron muestras de haces vasculares de plantas que presentaban sintomatología típica de la enfermedad, las muestras fueron procesadas y cultivadas en PDA para su purificación, obteniéndose 16 cepas, posteriormente fueron caracterizadas morfológicamente de acuerdo a las características de las colonias; se extrajo ADN de los aislados y mediante el empleo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se identificó molecularmente a FOCR1. Posteriormente, se determinó la cepa con mayor capacidad patogénica (mayor crecimiento micelial y alto número de esporas); para la evaluación del efecto antagónico de los sobrenadantes de PGPR's se determinó un Diseño Completamente al Azar, compuesto por un tratamiento control (FOCR1) y cinco tratamientos que contenían sobrenadantes bacterianos de *Pseudomonas protegens* (CHA0), *P. veronii* (R4), *Serratia marcescens* (PM3/8), *Acinetobacter calcoeceticus* (BMR2/12) y *Klebsiella variicola* (BO3/4). Se evaluó el porcentaje de crecimiento micelial y producción de esporas a los 5, 10 y 15 días. Los valores alcanzados en los ensayos de inhibición por los sobrenadantes bacterianos de R4 y CHA0 alcanzaron porcentajes de 62.22 % y 51.85 % de inhibición en el crecimiento micelial, y de igual forma estas mismas cepas redujeron el número de esporas en un porcentaje de 54.1 % y 45.3 % respectivamente, los resultados obtenidos determinan un alto porcentaje de control de FOCR1 por los sobrenadantes bacterianos en condiciones *in vitro*.

Palabras claves: aislamiento, control biológico, sobrenadantes bacterianos.

ABSTRACT

Banana cultivation is of economic importance for many countries. However, diseases such as Panama disease threaten its productivity, being the use of PGPR's (plant growth promoting rhizobacteria) an alternative for its control. The objective of this research was to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 (FOCR1) and its antagonism against PGPR's under *in vitro* conditions. Gros Michel banana plantations were located in different areas of the Guayas and Los Ríos provinces, samples of vascular bundles of plants that presented typical symptoms of the disease were taken, the samples were processed and cultivated in PDA for their purification, obtaining 16 strains. Later they were morphologically characterized according to the characteristics of the colonies; DNA was extracted from the isolates and using PCR (polymerase chain reaction), FOCR1 was molecularly identified. Subsequently, the strain with the greatest pathogenic capacity (greater mycelial growth and high number of spores) was determined; For the evaluation of the antagonistic effect of the PGPR's supernatants, a Completely Random Design was determined, composed of a control treatment (FOCR1) and five treatments containing bacterial supernatants of *Pseudomonas protegens* (CHA0), *P. veronii* (R4), *Serratia marcescens* (PM3/8), *Acinetobacter calcoeceticus* (BMR2/12) and *Klebsiella variicola* (BO3/4). The percentage of mycelial growth and spore production was evaluated at 5, 10 and 15 days. The values reached in the inhibition tests by the R4 and CHA0 bacterial supernatants reached percentages of 62.22% and 51.85% of inhibition in mycelial growth, and in the same way these same strains reduced the number of spores by a percentage of 54.1% and 45.3% respectively, the results obtained determine a high percentage of control of FOCR1 by the bacterial supernatants under *in vitro* conditions.

Keywords: isolation, biological control, bacterial supernatants.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Portada.....	i
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	ii
Certificación de culminación del proyecto de investigación.....	iii
Reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.....	iv
Agradecimientos.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Índice de contenido.....	x
Índice de figuras.....	xiv
Índice de tablas.....	xv
Índice de anexos.....	xvi
Código Dublín.....	xvii
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	
1.1. Problema de investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema.....	4
1.1.3. Sistematización del problema.....	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 conceptual.....	9
2.1.1. Origen e importancia del banano.....	9

2.1.1.1.	Descripción morfológica y taxonomía	9
2.1.1.2.	Cultivar Gros Michel.....	11
2.1.1.3.	Requerimientos edafoclimáticos	11
2.1.2.	Enfermedad mal de Panamá.....	11
2.1.2.1.	Morfología del agente causal	12
2.1.2.2.	Sintomatología.....	13
2.1.2.3.	Ciclo de vida.....	14
2.1.2.4.	Manejo de la enfermedad	14
2.1.3.	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR´s)	14
2.1.3.1.	Efectos de las PGPR´s	16
2.1.3.2.	Utilización de las PGPR´s en la agricultura	16
2.2.	Marco referencial	17
2.2.1.	Identificación y aislamiento de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i>	17
2.2.2.	Uso de bacterias con capacidad antagónicas	18
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		
3.1.	Localización de la investigación	20
3.2.	Tipo de investigación	20
3.3.	Métodos de investigación.....	20
3.4.	Fuentes de recopilación de información.....	20
3.5.	Diseño de la investigación.....	21
3.6.	Instrumentos de investigación	21
3.6.1.	Factores en estudio	21
3.6.2.	Tratamientos evaluados	21
3.7.	Manejo del experimento.....	22
3.7.1.	Identificación morfológica y molecular de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> raza 1	22
3.7.1.1.	Aislamiento de cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> raza 1	22

3.7.1.2.	Identificación morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1	23
3.7.1.3.	Extracción de ADN de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1	24
3.7.1.4.	Identificación molecular de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1.....	24
3.7.2.	Ensayos antagonistas a nivel <i>in vitro</i>	24
3.7.2.1.	Obtención de sobrenadantes de PGPR's con actividad antagonista.....	25
3.7.2.2.	Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y producción de esporas del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1	25
3.8.	Variables a estudiar	26
3.8.1.	Tipo de micelio.....	26
3.8.2.	Color de micelio	26
3.8.3.	Grupo aromático.....	26
3.8.4.	Diámetro de estructuras de resistencia	26
3.8.5.	Ancho conidial	26
3.8.6.	Longitud conidial	26
3.8.7.	Forma conidial.....	27
3.8.8.	Longitud del producto de PCR.....	27
3.8.9.	Crecimiento micelial	27
3.8.10.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial	27
3.8.11.	Producción de esporas	27
3.9.	Recursos humanos y materiales	27
3.9.1.	Recursos humanos.....	27
3.9.2.	Recursos materiales.....	28
3.9.3.	Recursos genéticos	29

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.	Resultados	31
4.1.1.	Aislamiento e identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1	31
4.1.1.1.	Identificación morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1	31

4.1.1.2. Identificación molecular de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza 1.....	36
4.1.2. Evaluación del efecto inhibitorio de los sobrenadantes bacterianos	38
4.1.2.1. Crecimiento micelial de <i>Fusarium. oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza 1	38
4.1.2.2. Producción de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza 1.....	38
4.2. Discusión.....	41
4.2.1. Aislamiento e identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cupense</i> raza 1	41
4.2.2. Evaluación del efecto inhibitorio de los sobrenadantes bacterianos	43
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	46
5.2. Recomendaciones.....	47
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA	
6.1. Bibliografía.....	49
CAPÍTULO VII: ANEXOS	
7.1. Anexos.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Distintas coloraciones presentes en los aislados fúngicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 obtenidos.. 33
- Figura 2:** Estructuras microscópicas de los aislados fúngicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1, visualizada a 40X..... 33
- Figura 3:** Promedio de crecimiento micelial a los 15 días de incubación de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1... 35
- Figura 4:** Evaluación del número de esporas de las cepas aisladas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1... 35
- Figura 5:** Perfiles electroforéticos del ADN obtenido de las cepas aisladas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1..... 36
- Figura 6:** Perfiles electroforéticos de la identificación molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 mediante ITS específicos..... 37
- Figura 7:** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 bajo la aplicación de sobrenadantes bacterianos, evaluado a los 15 días. 38
- Figura 8:** Contabilización del número de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 bajo la aplicación de sobrenadantes bacterianos, evaluado a los 15 días..39
- Figura 9:** Potencial antagonista de sobrenadantes bacterianos sobre el hongo fitopatígeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1.. 40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía del banano.	11
Tabla 2: Taxonomía del agente causal del mal de Panamá.	13
Tabla 3: Esquema del Análisis de Varianza utilizado en el ensayo.	21
Tabla 4: Tratamientos realizados en el ensayo a nivel <i>in vitro</i>	22
Tabla 5: Sitios de recolección de muestras de tejido vegetal de plantas con síntomas característicos de mal de Panamá.	22
Tabla 6: Cepas aisladas después del muestreo de plantas con sintomatología de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1.	31
Tabla 7: Características macroscópicas y microscópicas de los aislados de <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1 obtenidos después del muestreo.	32
Tabla 8: Medición de estructuras reproductivas y de resistencias de los aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1.	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Sitios de recolección de muestras de tejido vegetal de plantas con sintomatología característica de mal de Panamá causado por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1.....	57
Anexo 2: Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1 a partir de tejido vegetal infectado (haces vasculares).....	57
Anexo 3: Observación de estructuras macroscópicas y microscópicas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1.....	58
Anexo 4: Obtención de ADN de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1.....	58
Anexo 5: Protocolo del DNeasy® Plant Mini Kit.....	59
Anexo 6: Realización de PCR a partir de ADN para la identificación molecular de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1.....	60
Anexo 7: Cepas bacterianas utilizadas en la investigación.....	60

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	Identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1 (Mal de Panamá) y su antagonismo contra PGPR's en condiciones <i>in vitro</i> .
Autor:	Victor Alexi Tubay Muñoz
Palabras clave:	Antagonismo, PGPR's, control biológico, sobrenadantes bacterianos.
Fecha de publicación:	
Editorial:	Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), 2021.
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>El cultivo de banano es de importancia económica para muchos países. Sin embargo, enfermedades como el mal de Panamá amenazan su productividad, siendo el uso de PGPR's (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) una alternativa para su control. El objetivo de esta investigación fue de identificar <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1 (FOCR1) y su antagonismo contra PGPR's en condiciones <i>in vitro</i>. Se localizaron plantaciones de banano Gros Michel en distintas zonas de las provincias del Guayas y Los Ríos, se tomaron muestras de haces vasculares de plantas que presentaban sintomatología típica de la enfermedad, las muestras fueron procesadas y cultivadas en PDA para su purificación, obteniéndose 16 cepas, posteriormente fueron caracterizadas morfológicamente de acuerdo a las características de las colonias; se extrajo ADN de los aislados y mediante el empleo de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se identificó molecularmente a FOCR1. Posteriormente, se determinó la cepa con mayor capacidad patogénica (mayor crecimiento micelial y alto número de esporas); para la evaluación del efecto antagónico de los sobrenadantes de PGPR's se determinó un Diseño Completamente al Azar, compuesto por un tratamiento control (FOCR1) y cinco tratamientos que contenían sobrenadantes bacterianos de <i>Pseudomonas protegens</i> (CHA0), <i>P. veronii</i> (R4), <i>Serratia marcescens</i> (PM3/8), <i>Acinetobacter calcoeceticus</i> (BMR2/12) y <i>Klebsiella variicola</i> (BO3/4). Se evaluó el porcentaje de crecimiento micelial y producción de esporas a los 5, 10 y 15 días. Los valores alcanzados en los ensayos de inhibición por los sobrenadantes bacterianos de R4 y CHA0 alcanzaron porcentajes de 62.22 % y 51.85 % de inhibición en el crecimiento micelial, y de igual forma estas mismas cepas redujeron el número de esporas en un porcentaje de 54.1 % y 45.3 % respectivamente, los resultados obtenidos determinan un alto porcentaje de control de FOCR1 por los sobrenadantes bacterianos en condiciones <i>in vitro</i></p>
Descripción:	77 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm
URI:	

INTRODUCCIÓN

El cultivo de banano ocupa el cuarto lugar en el mundo, después de los cultivos de trigo, arroz y maíz. Es producido en países en desarrollo con climas tropicales, consumido por mercados industriales de altos ingresos y por países emergentes de clase media, siendo objeto de un comercio intensivo y constituyendo una cadena de valor mundial (Elbehri *et al.*, 2015). Nuestro país es uno de los mayores exportadores de banano en el mundo y su presencia en el mercado mundial va incrementándose constantemente. Siendo la producción de musáceas el primer rubro no petrolero de importancia económica para el país (Arias *et al.*, 2004). De acuerdo a los estudios de AGROCALIDAD (2016), en el Ecuador existen alrededor de 268,410 hectáreas de plantaciones de musáceas, de las cuales el 95% se exporta y abastece a 43 mercados a nivel mundial; es así como aproximadamente el 30% del consumo mundial es de banano ecuatoriano. La actividad bananera en el país brinda trabajo directo e indirecto a aproximadamente 2,5 millones de personas.

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (FOCR1) es una de las plagas más destructivas para las musáceas, la raza 1 de este hongo provocó en las décadas de los 50's y 60's la desaparición de miles de hectáreas de la variedad de banano Gros Michel, generando un gran impacto económico y social. Afortunadamente, la aparición de la variedad resistente Cavendish permitió la recuperación de la producción bananera (AGROCALIDAD, 2016). Sotomayor (2012) indica que este hongo es el causante de la enfermedad conocida como mal de Panamá, se caracteriza por producir tres tipos de esporas infectivas: microconidios, macroconidios y clamidosporas. Siendo las clamidosporas importantes estructuras de resistencias que pueden permanecer hasta 30 años viables en el suelo. La enfermedad es un clásico marchitamiento vascular que causa la disrupción el sistema de translocación de agua, causando síntomas foliares y el colapso final de las plantas afectadas

Distintos autores (Caballero *et al.*, 2013; Sotomayor, 2012; Wallace, 1952). han estudiado los síntomas típicos de la enfermedad en las plantas afectadas, inicialmente se caracterizan por presentar externamente un amarillamiento de las hojas bajas de la planta; a medida que las hojas se secan y marchitan, se rompen y caen; otro síntoma a nivel interno es la presencia de colores rojizos dentro de los rizomas y pseudotallos, decoloración del cormo y necrosis en los vasos xilemáticos del pseudotallo, además se presenta rajadura en la base del mismo. El control químico para esta enfermedad no existe actualmente, tampoco las buenas prácticas

culturales logran reducir la incidencia y severidad puesto que posee distintas vías de diseminación (Ploetz, 1994). Por otro lado, el control biológico ha demostrado ser una alternativa al manejo de la enfermedad; hongos del género *Trichoderma* han obtenido buenos resultados en el control de la enfermedad (Caballero *et al.*, 2013). En la investigación realizada por Lara (2009) se han encontrado diversas cepas de bacterias endofíticas que han registrado buenos resultados contra el crecimiento del patógeno.

Es por ello por lo que la presente investigación se fundamenta en la capacidad antagonista de distintas cepas de bacterias aisladas de la rizósfera de plantas de banano, las cuales se ha comprobado su efecto biocontrolador en otras enfermedades. Esta investigación se realizó para determinar la capacidad antagonista de las PGPR's a FOCR1 (mal de Panamá) *in vitro*, y consistió en el aislamiento e identificación morfológica y molecular de distintas cepas del patógeno, además la evaluación de la acción antagonistas de las bacterias PGPR's contra el patógeno.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

Actualmente, el mal de Panamá continúa siendo un problema para los pequeños productores que cultivan variedades susceptibles como el Gros Michel bajo sistemas agroforestales. Además, la raza 4 de *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* (FOCR4T) es capaz de atacar a los cultivares Cavendish, representando una amenaza para América Latina, principal continente exportador de banano. Por otra parte, constituye una amenaza para la seguridad alimentaria de los países y personas que dependen económicamente de este cultivo. La raza 1 establecida en Ecuador hace más de 60 años diezmó la producción de banano Gros Michel, desapareciendo casi por completo este cultivar y afectando la economía de los productores.

Al no existir un método de control químico eficaz para controlar la incidencia del mal de Panamá causado por FOCR1 es complicado su control. Las pocas plantaciones que mantienen el cultivar Gros Michel están desapareciendo, generando pérdidas económicas a los agricultores que venden dicho producto en el mercado nacional. Además, se estaría perdiendo un recurso genético de este cultivar, dotado de diversas características organolépticas a ser un producto apetecido. Por ello, se buscan nuevas alternativas biológicas que permita crear un control efectivo sobre esta enfermedad, de esta manera disminuir su incidencia y además servir de punto de inicio de investigación para hacer frente a este problema que aqueja al sector bananero con la aparición de la raza 4 de este patógeno.

1.1.2. Formulación del problema

¿Cuáles son los porcentajes de antagonismo proporcionados por las PGPR's contra la cepa con mayor capacidad patogénica identificada del hongo FOCR1, causante del mal de Panamá?

1.1.3. Sistematización del problema

- ¿Cómo se logrará aislar e identificar de forma morfológica y molecular cepas puras de FOCR1 en la zona del Guayas y Los Ríos?
- ¿Qué cepa de FOCR1 presenta mayor capacidad patogénica?

- ¿Cuál de las cepas de PGPR's presenta mayor capacidad antagonista a nivel *in vitro* contra FOCR1?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Identificar *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 (Mal de Panamá) y su antagonismo contra PGPR's en condiciones *in vitro*.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Identificar morfológicamente y molecularmente cepas de FOGR1 de las provincias del Guayas y Los Ríos.
- Determinar la cepa de FOGR1 con mayor capacidad patogénica.
- Evaluar la actividad antagonista de las PGPR's hacia la proliferación del hongo a nivel *in vitro*.

1.3. Justificación

Dentro de la economía del Ecuador, la producción bananera constituye un elemento de alta importancia para el país y para las personas que dependen de esta actividad. La enfermedad denominada mal de Panamá fue causa del declive de la producción bananera de las décadas de los 50 y 60 en el Ecuador y en la actualidad existen pocas investigaciones al control de su agente causal, FOGR1. Es destacable que este patógeno una vez establecido en una plantación, se propaga por diversos medios (bióticos, abióticos), permaneciendo viable en el suelo durante décadas, esto con la ayuda de sus estructuras de resistencias denominadas clamidosporas, esto hace que su control mediante la aplicación de plaguicidas sea ineficaz. Para frenar su proliferación se han manejado Buenas prácticas agrícolas (BPA), una de las cuales consiste en la utilización de métodos de control biológico, uno de ellos es la aplicación de rizobacterias, las cuales poseen características benéficas que generan metabolitos antagonistas con distintos efectos (fungicidas, bactericidas, entre otros).

La identificación de un patógeno causante de una enfermedad en un cultivo es el primer paso para poder determinar los distintos medios de control y de esta manera diseñar estrategias de control, de tal manera que se planteó la presente investigación, enfocada a la identificación y control de FOGR1 mediante la utilización de sobrenadantes bacterianos. En el país no existen estudios reportados sobre antagonismo de rizobacterias frente al hongo fitopatógeno FOGR1. Por lo que, el presente trabajo contribuirá con información nueva e importante sobre la actividad antagonista *in vitro* de la bacteria frente al hongo patógeno mencionado. Esta investigación también servirá para otros estudios enfocados a FOGR1 y FOGR4T, la cual actualmente amenaza la producción bananera mundial, generando resultados que serán de ayuda para otros investigadores en este campo de estudio.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Origen e importancia del banano

El banano es originario del Sureste Asiático, ocupa el cuarto lugar entre los cultivos agrícolas más importantes. Es fuente de alimento para habitantes de zonas tropicales húmedas. Entre el grupo de las frutas tropicales se posiciona en el primer lugar de consumo, debido a su precio, sabor, disponibilidad y valor alimenticio (Garrido *et al.* , 2011). La actividad agrícola de mayor de mayor importancia en la economía del Ecuador es el cultivo de banano; las exportaciones de banano durante el 2020 se ubicaron en 380,498 millones de cajas, un 6.58% mayor a lo exportado en el periodo del 2019, superior al del 2018, 2017 y 2016, debido al incremento de la oferta exportable pero también al incremento de la demanda en los diferentes mercados de destinos a excepción de Estados Unidos, Asia Oriental y Oceanía (ARCOBANEC, 2020).

Es destacable que esta actividad agrícola genera empleos directos e indirectos para más de un millón de familias, representando cerca de 2.5 millones de personas, aproximadamente un 17 % de la población del Ecuador. La superficie de siembra es de aproximadamente 230,000 hectáreas, concentrándose en tres provincias del litoral ecuatoriano, Guayas, Los Ríos y El Oro (92%) y en otras 7 provincias (8%). El rendimiento se relaciona a varios factores donde destacan el nivel de tecnificación, la zona y el tamaño de explotación. El rendimiento nacional reportado es de alrededor de 1,700 cajas/ha/año, cantidad que es considerablemente baja en comparación con los principales competidores como son Colombia, Costa Rica y Filipinas, quienes logran un promedio de 2,200; 2,500 y 3,000 cajas/ha/año, respectivamente (INIAP, 2011).

2.1.1.1. Descripción morfológica y taxonomía

Es una planta herbácea que posee pseudotallos aéreos, los cuales se originan de cormos carnosos, en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales conocidos comúnmente “hijos”. Posee hojas con distribución helicoidal (filotaxia espiral) y las bases foliares circundan el tallo (o cormo), de esta manera da origen al pseudotallo. Además, su inflorescencia es terminal y crece a través del centro del pseudotallo hasta alcanzar la superficie (Soto, 2008).

El sistema radicular está conformado por una abundante cantidad de raíces primarias, secundarias y terciarias. Existen dos clases de raíces primarias: las horizontales y las verticales, que conforman un sistema entrecruzado que le da un magnífico anclaje a la planta, se denomina pioneras a las verticales y alimentadoras a las horizontales (Torres, 2012).

El rizoma se denomina también cormo o bulbo tiene forma ovoidea, el meristemo apical es una cúpula plana, el ápice tiene bordes superiores que se encuentra insertado en el meristemo, el cual consta de dos partes. Una parte externa llamada zona cortical constituida por la exonera y la epidermis realiza una función de protección de la zona interna, se encuentra constituida básicamente de parénquima, en ella se originan las raíces la cual se encarga de la adsorción de los nutrientes del suelo, el meristema forma las vainas, limbos foliares y finalmente la inflorescencia que se transforma luego en el racimo (Tazán, 2003).

El sistema foliar del banano está compuesto por tres partes que se describen a continuación: las vainas foliares, que se originan en el cormo y están conformadas por la prolongación y modificación de sus hojas; el pseudopeciolo, que es el extremo superior o distal de la vaina foliar que se estrecha y se adelgaza hacia el limbo o lámina folia y la lámina foliar o limbo es una lámina delgada, muy verde en su cara superior y más o menos verdosa en la cara inferior (Soto, 2008).

La inflorescencia es aquella que contiene las flores que se desarrollarán en frutos, esta se apoya en el tallo floral. El denominado tallo floral crece a través del pseudotallo y brota en la parte alta de la planta una vez que ha emergido la última hoja cigarro. Las flores femeninas (pistiladas) aparecen primero. En las plantas de banano, el ovario se desarrolla en un fruto sin semillas, esto mediante la partenocarpia (sin polinización). Al aparecer la bráctea (hoja modificada) expone a las flores femeninas, las cuales se encuentran aglomeradas en los nódulos y que desarrollan las manos de frutos (Vézina y Baena, 2020).

El fruto es de textura carnosa y suave, de coloración amarilla cuando está maduro. El tiempo necesario para el desarrollo del fruto es entre 70 y 90 días (10 a 13 semanas). En lugares con temperaturas bajas (entre 20 a 26 °C) y períodos extensos de luminosidad, el desarrollo puede tardar entre 98 a 112 días (14 a 16 semanas) (Torres, 2012).

En la tabla 1 se presenta la clasificación taxonómica del banano:

Tabla 1: Taxonomía del banano.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Zingiberales
Familia	Musaceae
Género	<i>Musa</i>
Especie	<i>paradisiaca</i>

Fuente: (Ortíz y López, 2011).

2.1.1.2. Cultivar Gros Michel

Es conocido en el país como banano criollo o de seda, proviene de la mutación de Highgate-cocos, es muy susceptible a la enfermedad conocida como mal de Panamá y fue la variedad más utilizada hasta 1950. Se caracteriza por su porte alto (6 m), sus hojas miden aproximadamente 1 m de ancho por 4 m de largo y el racimo es de forma cilíndrica con capacidad de almacenar entre 10-14 manos de fruta (Vargas *et al.*, 2017).

2.1.1.3. Requerimientos edafoclimáticos

El clima ideal para el establecimiento del cultivo de banano es el tropical húmedo. La temperatura adecuada va desde los 25°C a 30°C. Su crecimiento se ve retardado a temperaturas inferiores a 16°C, pero no se han observado efectos negativos con temperaturas de 40°C cuando la provisión de agua es normal. Se considera que la pluviosidad necesaria varía de 100 a 110 mm de lluvia mensual. Es necesario realizar riegos, para ello es conveniente llevar un cronograma. Este cultivo necesita buena luminosidad y ausencia de vientos fuertes, para su establecimiento en óptimas condiciones. Los suelos óptimos son aluviales y que se encuentran en los valles costeros, arenosos, con suficiente arcilla y limo para retener el agua (Torres, 2012).

2.1.2. Enfermedad mal de Panamá

Esta enfermedad es causada por el hongo FOCSR1, se la considera una de las más destructivas en el cultivo de banano a nivel mundial y ha sido un problema de la industria bananera

durante muchos años. Existen cuatro razas de este hongo, la raza 1 ataca a la variedad Gros Michel, afectando también al clon Manzano. La raza 2 afecta a plátanos de cocción, tales como el Bluggoe o cuadrado y algunos tetraploides mejorados. La raza 3 se ha reportado que afecta a especies de *Heliconia*. En América, el mal de Panamá fue reportado por primera vez en Panamá en 1940, afectando a más de 50,000 ha de cultivo y ocasionando pérdidas de \$2,300,000.00 USD. La epidemia causada por la raza 1 impactó la industria bananera de exportación basada en la variedad Gros Michel, provocando la desaparición de la mayoría de las plantaciones comerciales entre 1950 y 1960 (Martínez y Valencia, 2016).

La acelerada distribución global de esta enfermedad se debe a un componente antropocéntrico, debido a que FOCR1 fue introducido por medio de cormos infectados, que frecuentemente no presentan síntomas, y fueron usados como material vegetativo de siembra en terrenos libres de la enfermedad (Ploetz y Pegg, 2000).

2.1.2.1. Morfología del agente causal

Es un hongo anamorfo del cual no se conoce su fase sexual (telomorfo), sus cepas no pueden distinguirse morfológicamente entre las distintas razas u otras especies, por lo cual es necesario su identificación molecular, produce macroconidios, microconidios y clamidosporas como mecanismos de dispersión y reproducción. Los microconidios son de 5 a 16×2.4 a $3.5 \mu\text{m}$, de una o dos células, de forma ovalada a renal y nacen en cabezas falsas (Martínez y Valencia, 2016).

Los macroconidios son de 27 a 55×3.3 a $5.5 \mu\text{m}$, de cuatro a ocho células, con forma de hoz y células basales en forma de pie (Ploetz, 2006). Las clamidosporas tienen entre 7 a $11 \mu\text{m}$ de diámetro. Las clamidosporas son globosas y se encuentran de manera individual o en pares, siendo estructuras de resistencia, las paredes celulares que la forman son gruesas, y su producción es abundante en los tejidos infectados en etapas avanzadas de la enfermedad. Los macroconidios se ubican intercaladas o en la parte terminal de las hifas del hongo (Davis, 2005; Lara, 2009).

De acuerdo con la Base de datos de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), la clasificación taxonómica del hongo causante del mal de Panamá se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Taxonomía del agente causal del mal de Panamá.

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Pezizomycotina
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>oxysporum</i>
Forma especial	<i>cubense</i>
Raza	1

Fuente: (EPPO, 2020).

2.1.2.2. Sintomatología

En el cultivo de banano, los síntomas externos producidos por la enfermedad se caracterizan por una clorosis o amarillamiento uniforme de las hojas adultas extendido por el margen foliar, el cual se extiende hacia la nervadura central de la hoja, hasta que esta queda completamente seca y de una coloración café; se puede o no manifestar un agrietamiento o rajadura en la base del pseudotallo. Estos síntomas se pueden confundir con los producidos por deficiencia de potasio, especialmente bajo condiciones de sequía y frío en etapas iniciales de la enfermedad. A continuación, las hojas se marchitan, de tal forma que suspendidas de la planta y unidas al pseudotallo, a manera de falda (Martínez y Valencia, 2016). En algunos cultivares de banano las hojas pueden permanecer verdes hasta que el peciolo se curva y colapsa (Pérez *et al.*, 2014).

En lo referente a la sintomatología interna, esta se caracteriza por un cambio de color de los haces vasculares, esto se observa cortando las raíces o pseudotallo. Esta decoloración del tejido vascular avanza hacia los haces vasculares del pseudotallo y algunas veces en el raquis. Al iniciarse la decoloración vascular, esta sucede en las vainas de las hojas externas del pseudotallo, las más internas cambian de color al final. Realizando un corte vertical del pseudotallo de una planta infectada se observan diversas líneas de color café, rojo o amarillo; mientras que en un corte transversal se observan en forma de anillos (Martínez y Valencia, 2016).

2.1.2.3. Ciclo de vida

FOCR1 puede estar presente en forma de clamidosporas en los residuos de plantas previamente infectadas, donde las secreciones radicales de plantas hospederas y no hospederas o el contacto directo con tejido sano de una variedad o cultivar susceptible permite que las clamidosporas germinen e inicien la infección. El micelio y conidios son producidos luego de 6 a 8 horas de infectar a la planta y se forman nuevas clamidosporas después de 2 a 3 días. La planta es penetrada por el agente patógeno a través de las raíces terciarias, pero no por las principales, a menos que haya exposición del cilindro central. Posteriormente, se localiza en el sistema vascular e invade los vasos conductores del xilema; produciendo conidios, los cuales son llevados a través de los haces vasculares donde inician nuevas zonas de infección, ocasionando su obstrucción y como consecuencia el movimiento del agua y nutrientes se reduce, ocasionando el marchitamiento de las plantas (Darce, 2013).

Cuando la enfermedad se encuentra en etapas más avanzadas el hongo se desarrolla fuera del sistema vascular, en el parénquima adyacente, originando grandes cantidades de conidios y clamidosporas; siendo estas últimas colocadas en el suelo cuando la planta infectada muere y permanecen en dormancia por varios años, hasta que existan las condiciones propicias para iniciar la infección. El ciclo se repite cuando las clamidosporas germinan e infectan nuevamente la planta (Davis, 2005).

2.1.2.4. Manejo de la enfermedad

Es una de las enfermedades de más difícil manejo y control; debido a que no existen medidas de control químico efectivas (Ploetz, 2006). Sin embargo, existen distintas prácticas culturales que permiten crear un conjunto de ambientes no favorables para el desarrollo del patógeno, y así evitar el desarrollo y la propagación de la enfermedad (Pérez *et al.*, 2014).

2.1.3. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR's)

En el suelo existen bacterias que son benéficas y poseen un rol importante para las plantas, porque al asociarse con ellas permiten, por una parte, incrementar su crecimiento y desarrollo y, por otra parte, les brinda protección contra otros organismos presentes en el suelo que generan enfermedades (Hernández y Escalona, 2003).

Se denominan PGPR's (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) a estas bacterias benéficas, pueden encontrarse en asociaciones simbióticas o en forma de vida libre. Al estar en vida libre se encuentran asociados a las partículas del suelo, de esta forma generan interacciones con las raíces de las plantas, en la denominada "zona de la rizósfera". De acuerdo a la necesidad de generar cultivos limpios, con trazas mínimas o nulas de agroquímicos que afecten la salud humana a largo plazo, se ha venido implementado el uso de los microorganismos benéficos del suelo, que pueden promover el crecimiento de las plantas y también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos (Peña y Reyes, 2007).

El crecimiento vegetal causado por las PGPR's es causado por dos tipos de mecanismos: indirectos y directos, o una mezcla de ambos, estos se dan en la interacción planta-suelo. Los mecanismos indirectos se dan cuando las PGPR's disminuyen o eliminan agentes fitopatógenos, produciendo sustancias antimicrobianas, sideróforos, enzimas líticas, entre otros compuestos; también se da por la competencia de nutrimentos o espacio en el nicho ecológico, así como por estimulación de las defensas naturales de la planta como el mecanismo de Resistencia Sistémica Inducida (RSI), la cual induce la resistencia de tejidos sistémicos frente al ataque por agentes patogénicos mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles, ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno, los cuales participan en la protección de las plantas contra distintas enfermedades (Shah, 2009).

Los mecanismos directos permiten el incremento de la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera, esto se da mediante la influencia en el metabolismo de las plantas. Los mecanismos son los siguientes: fijación de nitrógeno; síntesis de fitohormonas, vitaminas y enzimas; solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fosfato orgánico; oxidación de sulfuros; incremento de permeabilidad en la raíz; producción de nitritos; acumulación de nitratos; y reducción de la toxicidad por metales pesados y de la actividad de la enzima ACC desaminasa (Dobbelaere *et al.*, 2003). Se ha manifestado que en el efecto que *Azospirillum* ejerce sobre la planta intervienen distintos mecanismos que actúan simultánea y sucesivamente para incrementar el crecimiento vegetal (Bashan y Dubrovsky, 1996).

Estos microorganismos del suelo son capaces de producir beneficios en estadios tempranos de especies vegetales, mejorando el desarrollo de las raíces y brotes, incrementando la germinación, el contenido de nutrientes, presencia de clorofila, acelerando el tiempo de

floración y generando protección frente a fitopatógenos. Los géneros bacterianos más comunes descritos como PGPR's son *Pseudomonas* y *Bacillus* (Weller, 1988).

Para que una bacteria puede ser calificada como PGPR se considera su tiempo de persistencia en la rizósfera después de la inoculación, si el tiempo de persistencia es bajo, la población introducida poseerá una baja habilidad de competencia. Otro factor es la habilidad de colonizar la superficie de las raíces para desplegar un efecto fisiológico directo. Finalmente, que las PGPR inoculadas no provoquen daño a los factores bióticos y abióticos (Bach *et al.*, 2007).

2.1.3.1. Efectos de las PGPR's

Las PGPR's al generar sustancias antibióticas pueden producir dos distintos efectos antagonicos entre sí: los procesos inhibitorios que retrasan el desarrollo y elongación de las raíces y los que aumentan el crecimiento por inhibición de patógeno. Otros de los metabolitos producidos son los sideróforos, los cuales son sustancias de bajo peso molecular que tienen alta afinidad por el hierro. Al existir de escasez de hierro, las bacterias productoras de estas sustancias, secuestran al elemento, transformándolo en un factor limitante para grupos de microorganismos patogénicos hierro-dependientes (Bashan y Holguin, 1998).

Son eficientes en el control de patógenos al producir metabolitos secundarios que funcionan como antagonistas de microorganismos perjudiciales. En la mayoría de los casos, bacterias promotoras del crecimiento que han resultado efectivos agentes de biocontrol de nematodos y enfermedades fungosas, incluyendo al patógeno FOCCR1, corresponden a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, las cuales además han sido reportadas como organismos inductores de resistencia sistémica en las plantas (Kloepper *et al.*, 2004; Ramamoorthy *et al.*, 2001).

2.1.3.2. Utilización de las PGPR's en la agricultura

El proceso de inocular bacterias beneficiosas proviene de finales del siglo XIX, en Estados Unidos, donde el mezclar suelo inoculado naturalmente con semillas, se transformó en un método comúnmente usado para la inoculación de leguminosas. Después, se registró la primera patente (NITRAGIN) para inoculación de leguminosas con *Rhizobium* sp. y se desarrollaron productos con cepas de *B. megaterium* y *Azotobacter* sp. En el período de 1970

ocurrieron los dos mayores descubrimientos relacionados con la tecnología de inoculación: Redescubrimiento del *Azospirillum* y la acción de los grupos de *P. fluorescens* y *P. putida*, como agentes de control biológico (Bach *et al.*, 2007).

Las PGPR's poseen influencia y gran participación en el movimiento de nutrientes como nitrógeno y fósforo, siendo capaces de tomar formas no disponibles para la planta y transformarlas, hasta obtener formas asimilables para las células vegetales. Esto ha permitido que se utilicen biofertilizantes en diferentes cultivos, con el objetivo de reducir los costos y mantener o superar los rendimientos de la producción agrícola (Camelo *et al.*, 2011).

2.2. Marco referencial

2.2.1. Identificación y aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*

Darce (2013) aisló FOCR1 mediante muestras de tejido vegetal del pseudotallo de plantas enfermas de banano del cultivar Gros Michel. Las muestras de tejido vegetal infestadas fueron cortadas en segmentos e inmediatamente fueron desinfectadas. Posteriormente, bajo condiciones asépticas en la campana de flujo vertical, se esterilizó la superficie de cada segmento. Los segmentos fueron colocados en papel toalla para eliminar el exceso de agua y fueron colocados en cajas petri que contenían Potato Dextrosa Agar (PDA) al 10% suplementado con ácido láctico al 85% para prevenir el crecimiento de bacterias. Los platos fueron sellados con parafilm y almacenados a 24 °C por tres días. El micelio desarrollado en los segmentos de tejido vegetal fue subcultivado en cajas petri con PDA al 100%.

En la investigación de Wu *et al.* (2019) se identificó de manera molecular FOCR1, recolectándose 79 muestras de suelo de cuatro regiones de la ciudad de Zhangzhou, el área de producción primaria de banano en Fujian, de las cuales se aislaron 12 cepas que se identificaron mediante el análisis de secuencia del espaciador transcrito interno (ITS), la amplificación por PCR con el uso de cebadores específicos de FOC y ensayos de patogenicidad, 11 aislamientos pertenecieron a FOCR1 y 1 aislado a FOCR4T.

Leong *et al.*(2009) enfatizan que las características microscópicas y culturales no es suficiente para caracterizar FOCR1, ya que estas características podrían influir fácilmente

por factores ambientales. Como alternativa, utilizaron métodos moleculares para caracterizar y evaluar la variación genética de FOCCR1 de diferentes plantaciones de banano. Utilizaron dos métodos basados en PCR, ERIC-PCR y análisis de restricción del Espacio Transcrito Interno y regiones 5.8S (regiones ITS + 5.8S) aislados de diferentes plantaciones de banano.

2.2.2. Uso de bacterias con capacidad antagónicas

En los estudios que llevaron a cabo Sivamani y Gnanamanickam (1988) se determinó que distintas cepas de *P. fluorescens* presentaron antibiosis *in vitro* en distintos aislamientos de FOCCR1 y FOCCR4T. En su investigación utilizaron plantas de *Musa balbisiana* inoculadas con *P. fluorescens*, en los experimentos llevados en invernadero se observaron una menor severidad de la marchitez y decoloración interna, además, como producto de la supresión de FOCCR1 las plantas tratadas presentaron alta tasa de crecimiento radicular y altura de planta.

Kloepper *et al.* (2004), evidenciaron que algunas cepas del género *Bacillus* estimularon disminuciones significativas en la incidencia y severidad de distintas enfermedades en varios hospedantes, en pruebas de invernadero tanto como en ensayos de campo, las cepas fueron asociadas con varias alteraciones estructurales y citoquímicas en las plantas en el transcurso del ataque de los patógenos causantes de las enfermedades.

En la investigación, realizada por Lara (2009) se seleccionaron bacterias endofíticas para el biocontrol de FOCCR1. Nueve aislamientos del patógeno recolectados en distintos sectores de Costa Rica fueron utilizados en esta investigación. La patogenicidad de los aislamientos fue evaluada en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en condiciones de invernadero. Adicionalmente la actividad antagonista de bacterias endofíticas sobre el patógeno fue determinada, mediante una prueba de antibiosis y de biocontrol respectivamente. Los resultados obtenidos en el bioensayo de patogenicidad demostraron que ocho aislamientos de FOCCR1 fueron capaces de infectar las vitroplantas y producir síntomas característicos del mal de Panamá. A nivel *in vitro*, diecisiete bacterias endofíticas inhibieron el crecimiento de FOCCR1 hasta en un 65% en comparación con el testigo. Adicionalmente se detectó que plantas protegidas con las bacterias endofíticas presentaron valores mayores en las variables número de hojas, diámetro del pseudotallo, largo de hoja, peso foliar, peso radical y peso total de planta (Lara, 2009).

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización de la investigación

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Biología Molecular y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “La María”, ubicado en el Km 7 vía Quevedo – El Empalme, cuyas coordenadas geográficas son las siguientes: 79° 27” de longitud Oeste y 1° 06” de latitud Sur a una altitud de 67 msnm.

3.2. Tipo de investigación

El presente proyecto de investigación es de tipo experimental y fue realizado en condiciones de laboratorio, se realizó una caracterización a nivel morfológico y molecular para identificar FOCCR1, causante de la enfermedad mal de Panamá; también se realizó un experimento para determinar el antagonismo *in vitro* entre las PGPR's y el patógeno identificado.

3.3. Métodos de investigación

Se empleó el método inductivo para la determinación de las diferentes variables acorde a los objetivos planteados para la generación de información fidedigna del tema expuesto. También se usó el método deductivo que permitió partir de diferentes fuentes bibliográficas para el efecto antagonista *in vitro* de las PGPR's contra el hongo FOCCR1, y el método analítico fue la base para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en la evaluación de las variables mediante el uso de software de libre acceso.

3.4. Fuentes de recopilación de información

Para el desarrollo de esta investigación se recopiló información de fuentes primarias y secundarias:

- **Fuentes primarias:** Información obtenida a través de la observación directa de los resultados logrados al final de la investigación.
- **Fuentes secundarias:** Información extraída de libros, revistas científicas, artículos científicos, tesis y boletines divulgativos.

3.5. Diseño de la investigación

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de las PGPR's hacia el porcentaje de crecimiento micelial el hongo FOCCR1, con seis tratamientos y tres repeticiones para cada tratamiento. Cada unidad experimental consistió en una caja petri. Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 3) y las medias fueron comparadas mediante 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 recopilados durante el proyecto de investigación se lo realizó mediante el software InfoStat.

Tabla 3: Esquema del Análisis de Varianza utilizado en el ensayo.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	5
Error	12
Total	17

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Factores en estudio

En el presente trabajo de investigación se utilizaron como factor en estudio cinco diferentes cepas de PGPR's obtenidas del banco de cepas del laboratorio de Microbiología y Biotecnología Molecular de la UTEQ Campus "La María", contra la cepa de FOCCR1 que presentó mayor agresividad, determinada después de su aislamiento.

3.6.2. Tratamientos evaluados

Con la combinación de los dos factores: PGPR's y cepa agresiva de FOCCR1 (obtenida de los aislamientos) se establecieron cinco tratamientos más un control sin aplicación de PGPR's, se detallan a continuación (Tabla 4).

Tabla 4: Tratamientos realizados en el ensayo a nivel *in vitro*.

Tratamiento	Descripción
T ₁	FOCR1 (Control)
T ₂	FOCR1 + R4
T ₃	FOCR1 + PM3 -8
T ₄	FOCR1 + BMR2-12
T ₅	FOCR1 + BO3-4
T ₆	FOCR1 + CHA0

3.7. Manejo del experimento

3.7.1. Identificación morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* raza 1

3.7.1.1. Aislamiento de cepas de *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* raza 1

En las provincias de Los Ríos y Guayas (Anexo 1), se recolectaron muestras de tejido vegetal del pseudotallo de plantas enfermas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) que presentaban sintomatologías características de la enfermedad mal de Panamá (clorosis uniforme en hojas adultas, agrietamiento en la base del pseudotallo, cambio de color de los haces vasculares). Las muestras fueron procesadas por separado en bolsas plásticas con su correspondiente identificación, posteriormente fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología (UTEQ), los sitios de recolección se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Sitios de recolección de muestras de tejido vegetal de plantas con síntomas característicos de mal de Panamá.

Provincia	Cantón	Lugar
Los Ríos	Mocache	Finca Rodríguez
Los Ríos	Quevedo	Finca Peñafiel
Guayas	El Empalme	Finca La Guayaquil
Guayas	Balzar	Finca Chévez

Las muestras de tejido vegetal recolectado fueron cortadas en segmentos (Anexo 2), tomando en consideración los haces vasculares, e inmediatamente lavadas con agua durante tres minutos con agitación constante para remover impurezas adheridas según Pérez *et al.* (2014). Posteriormente, bajo condiciones asépticas en la campana de flujo vertical, se esterilizó la superficie de cada segmento en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante tres minutos con agitación constante, se realizaron tres lavados con agua destilada esterilizada por tres minutos en cada ocasión. Los segmentos de tejido vegetal fueron colocados en papel toalla.

Cinco segmentos fueron colocados por cada caja petri con Potato Dextrosa Agar (PDA) al 10% suplementado con Cloranfenicol para prevenir el crecimiento bacteriano. Los platos fueron sellados con parafilm y almacenados a 26 °C por 4 días. El micelio de FOCR1 desarrollado en los segmentos de tejido vegetal fue subcultivado en platos petri con PDA al 100% y posteriormente sellados y almacenados por 7 días a 24 °C según Agrios (2005). Los aislamientos recolectados fueron identificados con sus códigos respectivos. Para la conservación de los aislados se utilizó el método de tubo inclinado, descrito por Cañedo y Ames (2004).

3.7.1.2. Identificación morfológica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Para la caracterización morfológica se analizaron diferentes variables de las colonias del hongo, siguiendo los descritos planteados por Leslie y Summerell (2008). Se colocaron discos de agar que contenían micelio del hongo puro en cajas petri en PDA y se midió el crecimiento, se analizó el color, textura, tamaño y forma de esporas y longitud de micelio (Anexo 3). Para medir el crecimiento radial del hongo se siguió la metodología descrita por Lara (2009), se sembraron muestras en cajas petri en un medio PDA a 28°C en la incubadora, realizándose tres evaluaciones durante 15 días a cada colonia aislada. Se analizó el color, textura y presencia o ausencia de olores característicos a los 7 y 14 días después de la siembra en el medio y se realizó un cuadro comparativo para comprobar las diferenciaciones morfológicas entre colonias. Para el diámetro, forma de las esporas y tamaño del micelio se realizó un raspado de la caja petri y se colocó en portaobjetos con una gota de agua estéril y 20 µl de azul de tripan para la coloración, se fijó la muestra flameándola en el mechero y se procedió a observar en un microscopio con un lente de 40x con una adaptación de una cámara micrometrografa.

3.7.1.3. Extracción de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1

Se sembraron discos de agar que contenían micelio del hongo de 5 mm de radio en un medio PDA y se los dejó en crecimiento durante 15 días, hasta que se obtuvo un considerable crecimiento micelial en cada cepa (Anexo 4), después se procedió a la extracción mediante el DNeasy Plant Mini Kit®, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 5). (QIAGEN, 2016) y las muestras de ADN obtenidas fueron almacenadas a -20 °C.

3.7.1.4. Identificación molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1

Se realizó una PCR, previamente obtenido el ADN mediante el kit DNeasy Plant Mini Kit®, se emplearon la pareja de cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) que generan un fragmento específico de 600 pb para FOCR1 según lo descrito por Leong *et al.* (2009). La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos de 1,5 ml de capacidad con un volumen final de 20 µL que contenía: 9.7 µl de H₂O Ultrapura, 1 µl de DNTP's, 1 µl ITS1 (forward), 1 µl ITS4 (reverse), 2 µl Buffer 10x (+MgCl₂), 3 µl Buffer 10x (-MgCl₂), 0,3 µl de Taq polimerasa y 2 µl de ADN.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador y se utilizó el programa planteado por Leong *et al.* (2009): 94 °C por 1 minuto, para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C por 30 segundos, alineación a 55 °C por 1 minuto, la hibridación durante 1 minuto a 72 °C y una elongación final de 72 °C por 5 minutos y 4°C por 5 minutos (Anexo 6). Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (4µg/ml), se utilizó un marcador molecular de 100 bp DNA ladder (Invitrogen), la electroforesis se llevó a cabo 60 minutos a 110V y se expuso a luz UV para la observación de los fragmentos, según Dita *et al.* (2013).

3.7.2. Ensayos antagonistas a nivel *in vitro*

Previo a la realización de los ensayos antagonistas con los sobrenadantes bacterianos, se determinó la cepa aislada de FOCR1 con mayor capacidad patogénica, basándose en su crecimiento micelial y en su producción de esporas; siendo estas las principales características a considerar.

3.7.2.1. Obtención de sobrenadantes de PGPR's con actividad antagonista

Se hizo crecer las bacterias utilizadas en este estudio en 50 ml de medio de cultivo líquido King B (Anexo 7) y se las dejó en agitación a 150 rpm durante 48 h, posteriormente fueron centrifugadas en tubos Falcon de 15ml a 300 x g por 3 min. Se descartó el pellet y solo se recuperó el sobrenadante, por triplicado. Se ubicó el sobrenadante obtenido en tubos eppendorf de 1.5ml y se lo centrifugó a 10x g por 3 min. Se filtraron las muestras empleando Nalgane Syringe de 0.2 µm y fueron sometidos a un choque térmico de 15 min a 90 °C y 15 min a -40 °C, de acuerdo a lo reportado por Swain y Ray (2009), y Karimi *et al.* (2012).

3.7.2.2. Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y producción de esporas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Para la evaluación del crecimiento micelial se colocaron 9.8 ml de medio sólido PDA en cajas petri, se lo dejó solidificar y se le agregaron 0.2 ml del sobrenadante de PGPR's, se colocó un disco de agar del hongo FOCR1 incubado a 28 °C de 1 cm de diámetro sobre el medio, según lo descrito por Lara (2009).

La evaluación se realizó a los 5, 10 y 15 días, midiendo el porcentaje de inhibición desde el borde del disco de agar con micelio hasta el crecimiento del hongo mediante la siguiente fórmula planteada por Tejera *et al.* (2012):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Crecimiento del control} - \text{Crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del control}} * 100$$

Para el conteo de esporas se colocaron 10 ml de agua destilada estéril en la caja petri donde se desarrolló el hongo, se vertió una gota de tween 20 y con un rastrillo se raspó el micelio contenido en la caja petri. Se recolectó 1 ml de la solución y se filtraron las esporas por una gasa estéril para la separación del micelio. Se colocó 20 µl de lo filtrado en la cámara de Neubauer y se lo observó en el microscopio OLYMPUS© para su conteo. Se determinó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula planteada por Tejera *et al.* (2012):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\# \text{ de esporas del control} - \# \text{ de esporas del tratamiento}}{\# \text{ de esporas del control}} * 100$$

3.8. Variables evaluadas

3.8.1. Tipo de micelio

Se evaluó de manera cualitativa si el tipo de micelio que formaba el aislado en medio PDA era de tipo algodonoso, voluble, no voluble o liso, según I Lara (2009).

3.8.2. Color de micelio

Se evaluó cualitativamente si el color de micelio que forma el aislado en medio PDA se ajusta a lo descrito por Leslie y Summerell (2008).

3.8.3. Grupo aromático

Se evaluó cualitativamente si los olores generados por los aislados pertenecían al grupo odoratum (olor característico) o al grupo inodoratum (sin olor), conforme a Stover (1959).

3.8.4. Diámetro de estructuras de resistencia

Se midió el diámetro de las estructuras de resistencia en μm , utilizando una cámara adaptada a un microscopio óptico de 40X y el software IS Capture©, según Riveros *et al.* (2001).

3.8.5. Ancho conidial

Se midió el ancho de las microconidias y macroconidias en μm , utilizando una cámara adaptada a un microscopio óptico de 40X y el software IS Capture©, de acuerdo a los estudios realizados por Riveros *et al.* (2001).

3.8.6. Longitud conidial

Se midió la longitud de las microconidias y macroconidias en μm , utilizando una cámara adaptada a un microscopio óptico de 40X y el software IS Capture©, de acuerdo a las investigaciones de Riveros *et al.* (2001).

3.8.7. Forma conidial

Se determinó la forma de las microconidias y macroconidias, de acuerdo a las características morfológicas, descritas por Martínez y Valencia (2016) y Leslie y Summerell (2008).

3.8.8. Longitud del producto de PCR

Se midió la longitud del producto de PCR en pares de bases (pb), para su determinación se utilizó un marcador molecular de 100 pb (Invitrogen©), para la visualización se utilizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, de acuerdo a Dita *et al.* (2013).

3.8.9. Crecimiento micelial

Se realizaron las mediciones en cm con una regla graduada cada 3 días por un lapso de 15 días en las cajas petri, según Lara (2009).

3.8.10. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

La evaluación se la realizó a los 5, 10 y 15 días, midiendo en cm con una regla desde el borde del disco de agar hasta el crecimiento del hongo, el porcentaje de inhibición se obtuvo mediante la fórmula planteada por Tejera *et al.* (2012).

3.8.11. Producción de esporas

La producción de esporas se determinó mediante el conteo en una cámara de Neubauer y la aplicación de la fórmula planteada por Tejera *et al.* (2012).

3.9. Recursos humanos y materiales

3.9.1. Recursos humanos

El recurso humano que contribuyó para la realización del presente proyecto de investigación se nombra a continuación:

- Director del proyecto de investigación Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez.
- Estudiante y autor del Proyecto de Investigación: Victor Alexi Tubay Muñoz.

3.9.2. Recursos materiales

a) Equipos

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| • Balanza analítica | • Microscopio |
| • Baño María | • Cámara de microscopio |
| • Estufa | • Nevera |
| • Microondas | • Vortex |
| • Autoclave | • Destilador de agua |
| • Potenciómetro | • Centrífuga |
| • Termómetro | • Uv transluminador |
| • Cabina de flujo laminar | • Juego de micropipetas |

b) Materiales de laboratorio y reactivos

- | | |
|---|---|
| • Puntas azules (1000 µl) | • PDA (Papa Dextrosa Agar) |
| • Puntas amarillas (200 µl) | • Tubo PCR individual 0.2 ml. Cs/1000. |
| • Tubos de micro centrifuga | • Kit de purificación de PCR |
| • Tubos Eppendorf 1.5 ml | • Medio King B |
| • Guantes quirúrgicos | • Buffer 1x |
| • Papel toalla | • Blue Juice |
| • Alcohol 75% | • Agua Ultra pura |
| • Cajas petri | • Buffer PCR 10X |
| • Parafilm | • Cebadores o primers (ITS1, ITS4). |
| • Guantes | • Taq Polimerasa. |
| • Fundas de polipropileno | • DNTP's |
| • Cloro | • Bromuro de Etidio (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃) |
| • Kit de extracción de ADN, DNeasy Plant Mini Kit© (QIAGEN) | • Cloruro de magnesio (MgCl ₂) |
| | • Tween 20 |

3.9.3. Recursos genéticos

Para los ensayos antagonistas *in vitro* se utilizaron PGPR's de los géneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Acinetobacter* que se encuentran almacenadas en el banco de cepas bacterianas del laboratorio de Biología Molecular a -40°C, las cepas fueron las siguientes:

- *P. protegens*, cepa CHA0
- *P. veronii*, cepa R4
- *Serratia marcescens*, cepa PM3/8
- *Acinetobacter calcoeceticus*, cepa BMR2/12
- *Klebsiella variicola*, cepa BO3/4

El patógeno se obtuvo determinando la cepa con mayor capacidad patogénica (mayor crecimiento micelial y alta producción de esporas) de las aisladas previamente, el hongo utilizado fue el siguiente:

- FO CR1

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados

4.1.1. Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Se realizó el aislamiento de FOCR1 a partir de haces vasculares provenientes de banano Gros Michel con sintomatología de la enfermedad, los segmentos de fueron incubados en medio PDA durante 4 días a 26 °C, posteriormente fueron purificados en cajas petri con PDA al 100% y posteriormente sellados y almacenados por 7 días a 24 °C. Los aislamientos recolectados fueron identificados con sus códigos respectivos (Tabla 6) y conservados en tubos inclinados.

Tabla 6: Cepas aisladas después del muestreo de plantas con sintomatología de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1.

Provincia	Cantón	Coordenadas geográficas	Codificación de cepas	N° cepas
Los Ríos	Quevedo	1°04'30.5"S 79°28'26.7"W	FOC 1-1, FOC 1-2, FOC 1-3, FOC 1-4, FOC 1-5, FOC 1-6	6
Los Ríos	Mocache	1°06'51.1"S 79°36'22.9"W	FOC 2-1, FOC 2-2	2
Guayas	El Empalme	1°06'00.6"S 79°39'28.3"W	FOC 3-1, FOC 3-2	2
Guayas	Balzar	1°18'06.4"S 79°51'18.9"W	FOC 4-1, FOC 4-2, FOC 4-3, FOC 4-4, FOC 4-5, FOC 4-6,	6

4.1.1.1. Identificación morfológica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Los aislamientos que fueron cultivados en medio PDA presentaron micelio algodonoso y algunas diferencias en la pigmentación en el reverso. Las pigmentaciones que se llegaron a apreciar fueron desde blancas, con tonalidades amarillentas, color pardo, color melón, violetas y rosáceas (Figura 1). Así mismo, con base a la producción de compuestos volátiles los aislamientos fueron clasificados dentro del grupo "odoratum", si producían un olor aromático similar a algunos aldehídos o en el grupo "inodoratum" si no los producían, esto se indica en la tabla 7.

Por otra parte, bajo el microscopio se observaron el micelio, microconidios, macroconidios y clamidosporas de cada aislamiento de FOCCR1, determinándose la forma de cada estructura, siendo las microconidias de forma ovalada en todos los aislados, las macroconidias de forma ligeramente curvas, las clamidosporas se presentaron a los 15 días de cultivo, siendo individuales o agrupadas en cadenas, de forma esférica (Figura 2).

Tabla 7: Características macroscópicas y microscópicas de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 obtenidos después del muestreo.

Cepa	Micelio	Coloración	Grupo aromático	Forma de microconidias	Forma de macroconidias
FOC 1-1		Blanca con pigmentación violeta			
FOC 1-2		Blanca amarillenta			
FOC 1-3		Blanca con pigmentación violeta			
FOC 1-4		Blanca amarillenta			
FOC 1-5		Blanca rosacea			
FOC 1-6		Blanca rosacea	Odoratum		
FOC 2-1		Blanca con ligera pigmentación violeta			
FOC 2-2		Blanca con pigmentación parda			
FOC 3-1	Algodonoso	Blanca con pigmentación violeta		Ovalados	Ligeramente curvos
FOC 3-2		Blanca con ligera pigmentación violeta			
FOC 4-1		Blanca amarillenta	Inodoratum		
FOC 4-2		Blanca			
FOC 4-3		Blanca con pigmentación melón	Odoratum		
FOC 4-4		Blanca amarillenta			
FOC 4-5		Blanca con pigmentación violeta			
FOC 4-6		Blanca con pigmentación violeta	Inodoratum		

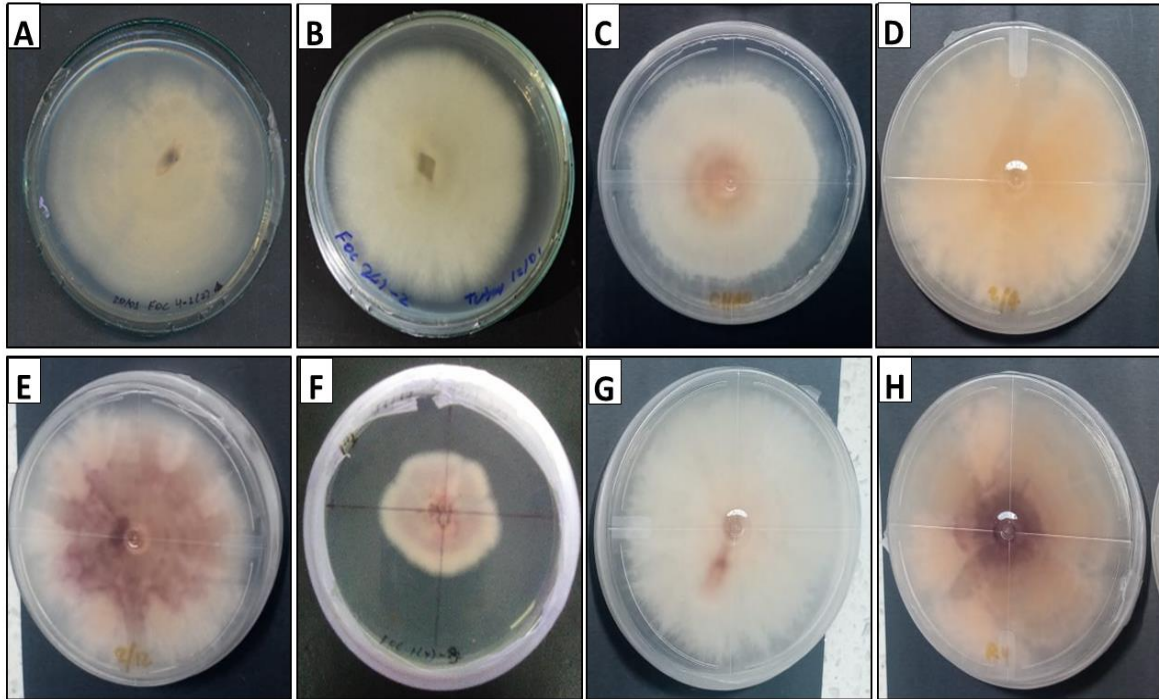


Figura 1: Distintas coloraciones presentes en los aislados fúngicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 obtenidos. A) Blanca. B) Blanca amarillenta. C) Blanca con pigmentación rosácea. D) Blanca melón. E) y F) Blanca con pigmentación violeta. G) Blanca con ligera pigmentación violeta. H) Blanca con pigmentación parda.

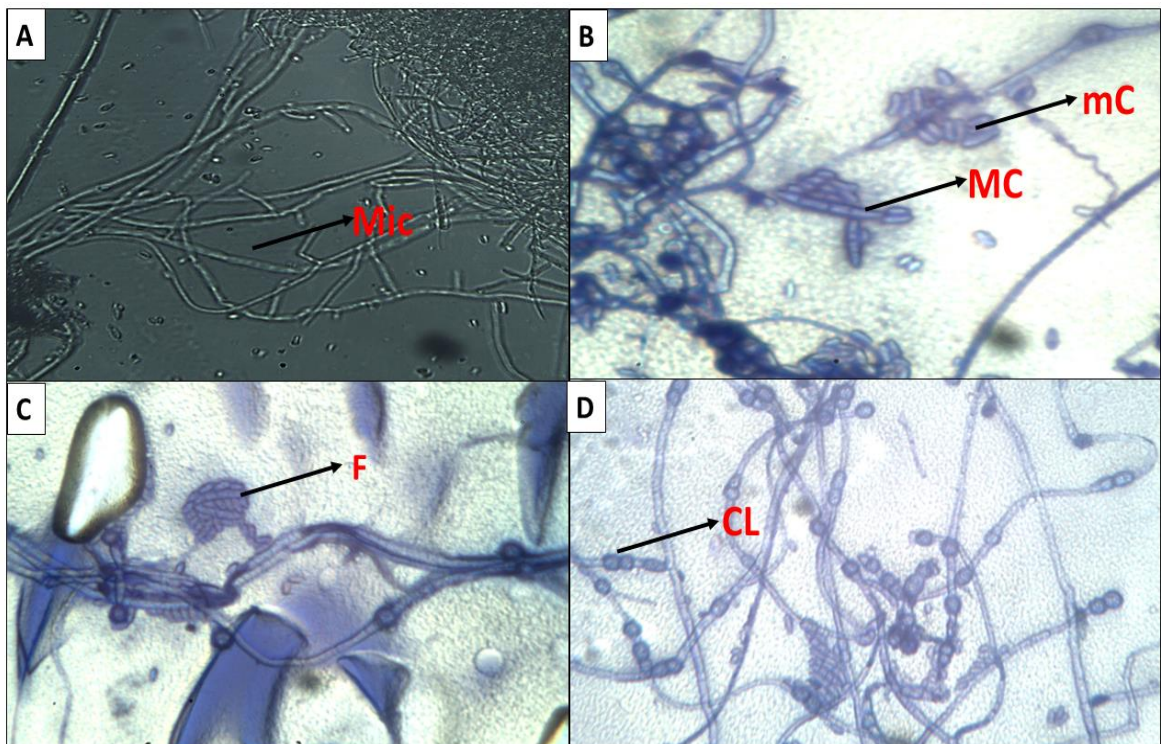


Figura 2: Estructuras microscópicas de los aislados fúngicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1, visualizada a 40X. A) Micelio (Mic). B) Macroconidias (MC), Microconidias (mC). C) Fiálides (F). D) Clamidosporas (CL).

En el medio de cultivo PDA, las microconidias tuvieron en promedio 2.9 μm de ancho x 6.1 μm de largo, las macroconidias 3.6 μm de ancho x 30.8 μm de largo y las clamidosporas promediaron un diámetro de 7.7 μm , lo cual se visualiza en la tabla 8.

Tabla 8: Medición de estructuras reproductivas y de resistencias de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1.

CEPA	Microconidias		Macroconidias		Clamidosporas
	Ancho (μm)	Largo (μm)	Ancho (μm)	Largo (μm)	Diámetro (μm)
FOC 1-1	2.5	6.3	3.9	28.2	7.2
FOC 1-2	2.6	6.5	3.8	27.8	7.5
FOC 1-3	2.5	6.2	3.5	30.2	7.3
FOC 1-4	3.4	7.1	4.2	33.8	8.5
FOC 1-5	2.6	6.3	4.3	30.8	8.1
FOC 1-6	2.8	6.2	3.5	29.6	7.2
FOC 2-1	2.9	6.4	4.2	32.6	7.1
FOC 2-2	3.1	5.9	3.5	33.2	7.5
FOC 3-1	3.1	6.1	3.3	36.5	7.6
FOC 3-2	2.5	6.3	3.8	29.8	8.6
FOC 4-1	2.6	5.5	4.1	29,5	8.2
FOC 4-2	2.6	5.4	3.2	28.5	7.5
FOC 4-3	3.2	5.1	3.4	30.1	7.6
FOC 4-4	3.1	6.1	3.1	31.2	7.5
FOC 4-5	3.3	6.4	3.2	29,5	7.8
FOC 4-6	3.0	6.3	3.3	32.2	8.2
PROMEDIO	2.9	6.1	3.6	30.8	7.7

La tasa de crecimiento radial de los aislados fúngicos obtenidos osciló entre 2.8 a 3.8 cm al cabo de 15 días en la oscuridad, a una temperatura de 25 °C. Siendo el aislamiento FOC 1-4 el que presentó la mayor tasa de crecimiento (3.8 cm), la cepa que presentó la menor tasa de crecimiento fue FOC 1-2, con 2.8 cm de radio, los resultados señalados anteriormente se visualizan en la figura 3.

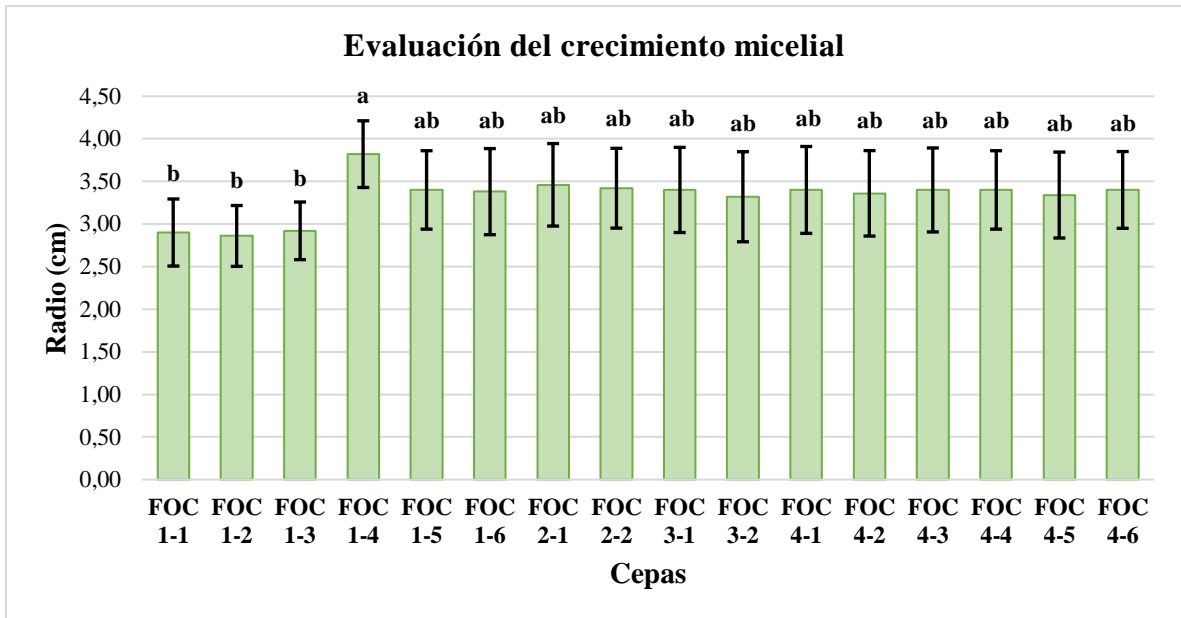


Figura 3: Promedio de crecimiento micelial a los 15 días de incubación de los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Las barras de error indican \pm EE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

De los 16 aislados obtenidos, la cepa FOC 1-4 evidenció el mayor número de esporas (3.47×10^7), mientras que la cepa FOC 1-2 mostró 2.18×10^7 esporas, las demás cepas fueron estadísticamente iguales con promedios entre 2.61×10^7 y 3.03×10^7 esporas, según se visualiza en la figura 4.

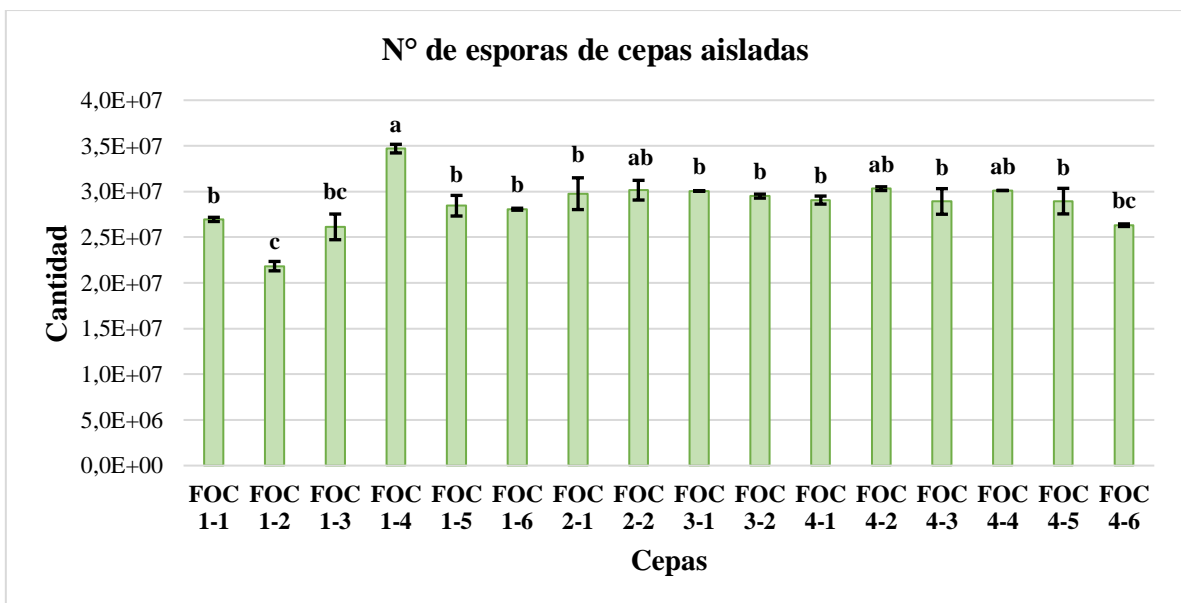


Figura 4: Evaluación del número de esporas de las cepas aisladas de de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Las barras de error indican \pm EE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

De acuerdo con los resultados obtenidos sobre el crecimiento micelial (Figura 3) y número de esporas (Figura 4) se determinó a la cepa FOC 1-4 como la más agresiva, siendo la utilizada en los ensayos de antagonismo con los sobrenadantes bacterianos.

4.1.1.2. Identificación molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1

El ADNg fue extraído de cultivos puros de 15 días de incubación, de los aislados obtenidos previamente, y visualizado mediante electroforesis (Figura 5), las muestras de ADN obtenidas fueron almacenadas a -20 °C.

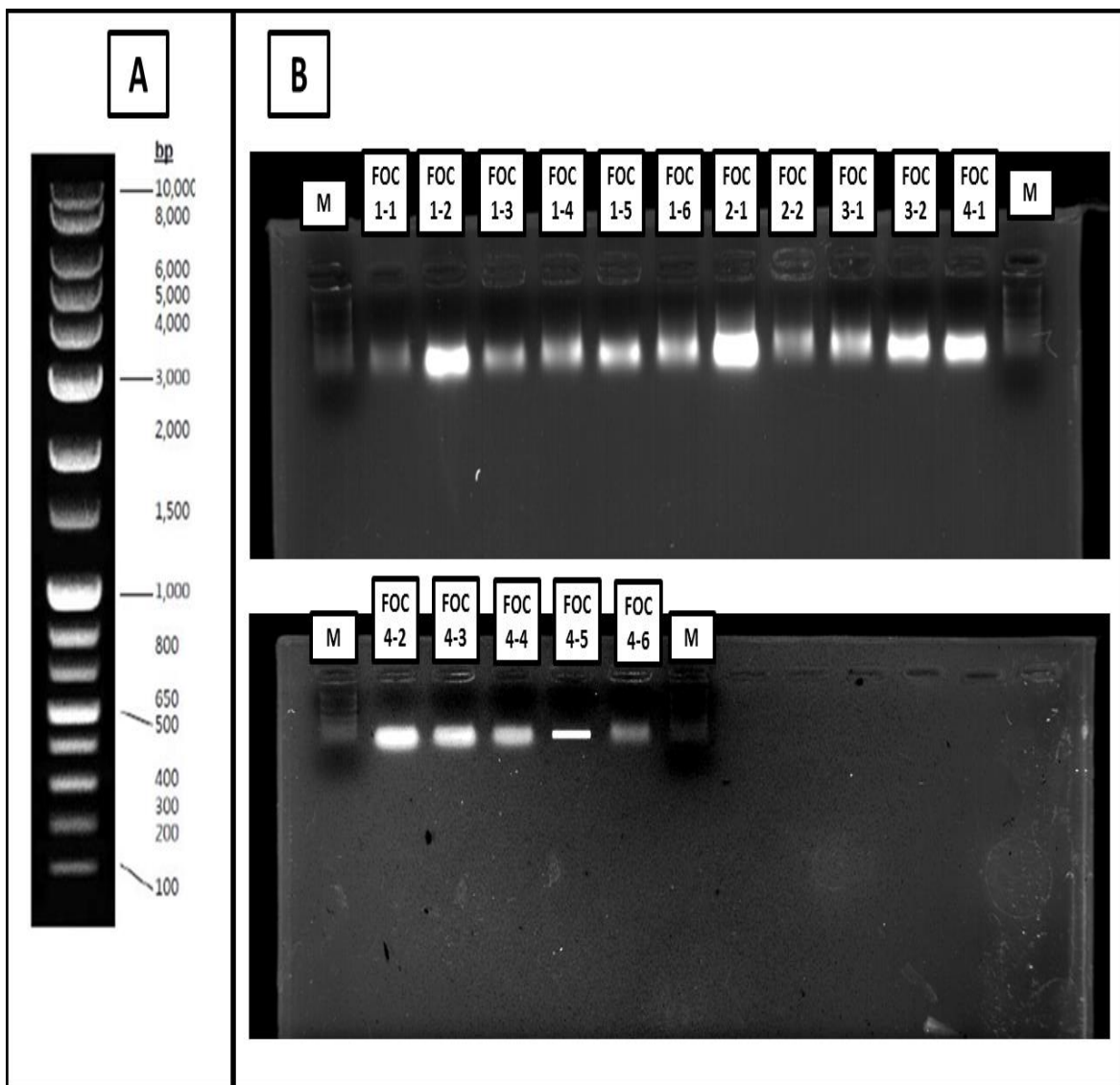


Figura 5: Perfiles electroforéticos del ADN obtenido de las cepas aisladas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1. A) Marcador molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. B) Perfil electroforético del ADN de los 16 aislados obtenidos durante la investigación. Carril M= marcador molecular 1 Kb.

La identificación de FOCR1, se llevó a cabo por PCR empleando los primer ITS1 y IST4 (White *et al.*, 1990), los cuales generan un producto de amplificación de 600 bp. De los 16 aislados se determinó que 13 correspondían al patógeno en estudio y 3 aislados (FOC2-C, FOC4-5, FOC4-6) no correspondía al no amplificar los 600 pb. La veracidad de la amplificación fue determinada al no observar productos de amplificación inespecífica en el control con el hongo *Moniliophthora roreri* y el control con agua (Figura 6).

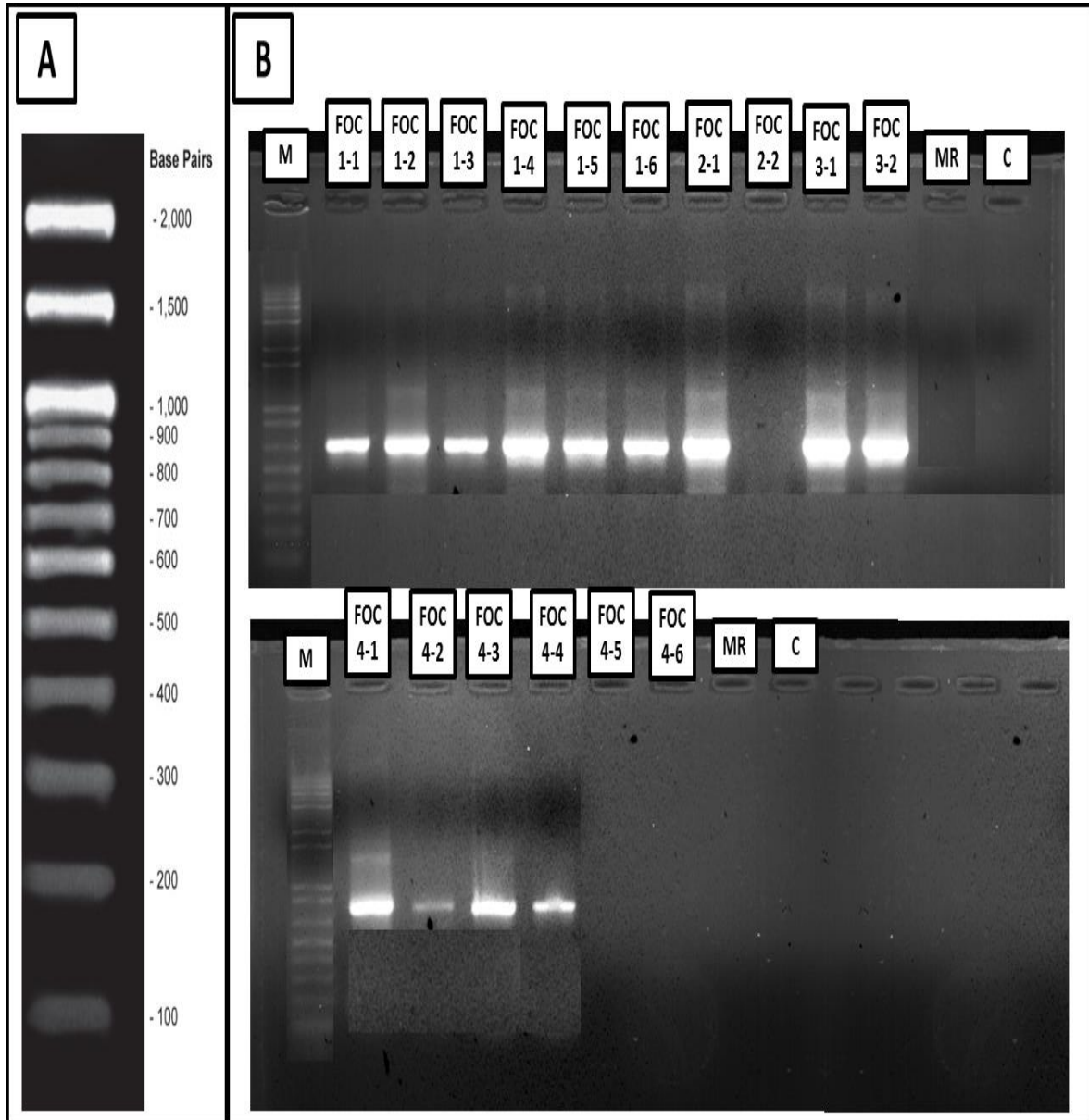


Figura 6: Perfiles electroforéticos de la identificación molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 mediante ITS específicos. A) Marcador molecular 100 bp y B) Amplicón 600 bp ITS específico para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 cepas FOC 1-1, FOC1-2, FOC1-3, FOC 1-4, FOC 1-5, FOC 1-6, FOC 2-1, FOC 3-1, FOC 3-2, FOC 4-1, FOC 4-2, FOC 4-3, FOC4-4. Cepas no amplificadas FOC2-C, FOC4-5, FOC4-6. MR= *Moniliophthora roreri*, C= Control agua.

4.1.2. Evaluación del efecto inhibitorio de los sobrenadantes bacterianos

4.1.2.1. Crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1

A los 15 días de evaluación del efecto de los sobrenadantes bacterianos sobre el patógeno en estudio se determinó que el porcentaje de inhibición al crecimiento micelial fue mayor en el T2 (*P. veronii* R4) y T6 (*P. protegens* CHA0) con porcentajes correspondientes al 62.22 % y 51.85 % respectivamente, los demás tratamientos presentaron valores fluctuantes entre 14.81 % y 20.74 %, frente al control sin adición de sobrenadantes bacterianos, que desarrolló micelio de manera normal (Figura 7).

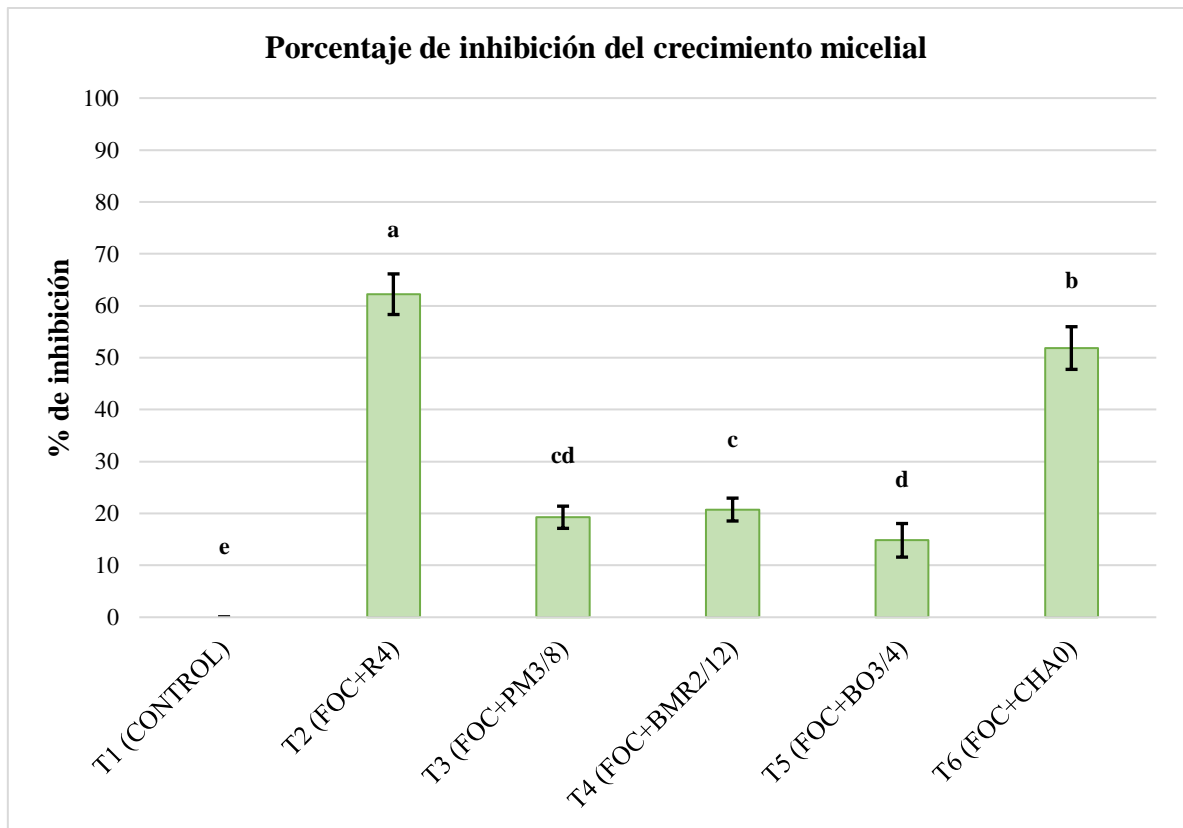


Figura 7: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 bajo la aplicación de sobrenadantes bacterianos, evaluado a los 15 días . Las barras de error indican \pm EE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.1.2.2. Producción de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1

En esta investigación se determinó que los sobrenadantes presentaron actividad inhibitoria en el conteo del número de esporas (macroconidias y microconidias) de FOCR1, los

sobrenadantes de los aislados bacterianos de *P. veronii* R4 (T2) y *P. protegens* CHA0 (T6) evidenciaron el menor número de esporas, 1.56×10^7 y 1.86×10^7 respectivamente, siendo el el control (T1) sin sobrenadantes bacterianos el tratamiento que presentó la mayor cantidad de esporas, 3.40×10^7 , los demás tratamientos evaluados presentaron promedios fluctuantes entre 2.1×10^7 y 2.25×10^7 , lo mencionado anteriormente se detalla en la figura 8.

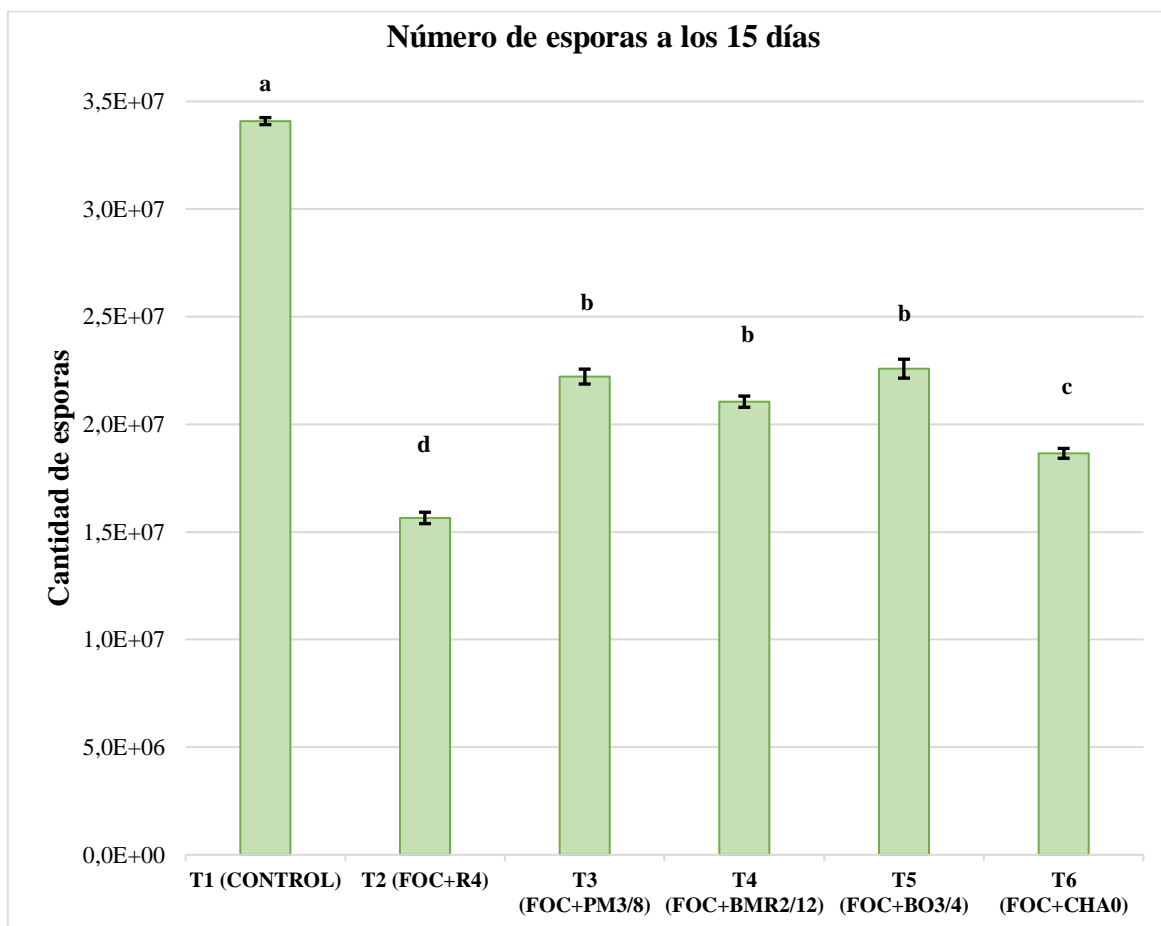


Figura 8: Contabilización del número de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1 bajo la aplicación de sobrenadantes bacterianos, evaluado a los 15 días. Las barras de error indican $\pm EE$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

En la figura 9 se observa la inhibición conferida por los sobrenadantes sobre el patógeno en estudio a causa de la producción de metabolitos bacterianos disueltos en el medio de cultivo en el cual se desarrollaron los aislados fúngicos, se evidenció que los sobrenadantes bacterianos provocaron el retraso del crecimiento micelial, la ruptura de las células fúngicas y la disminución de la producción de esporas. La cepa CHA0 y R4 evidenciaron la degradación de las hifas de FOCR1 por la reducción de crecimiento y la formación escasa de micelio en los bordes de la colonia.

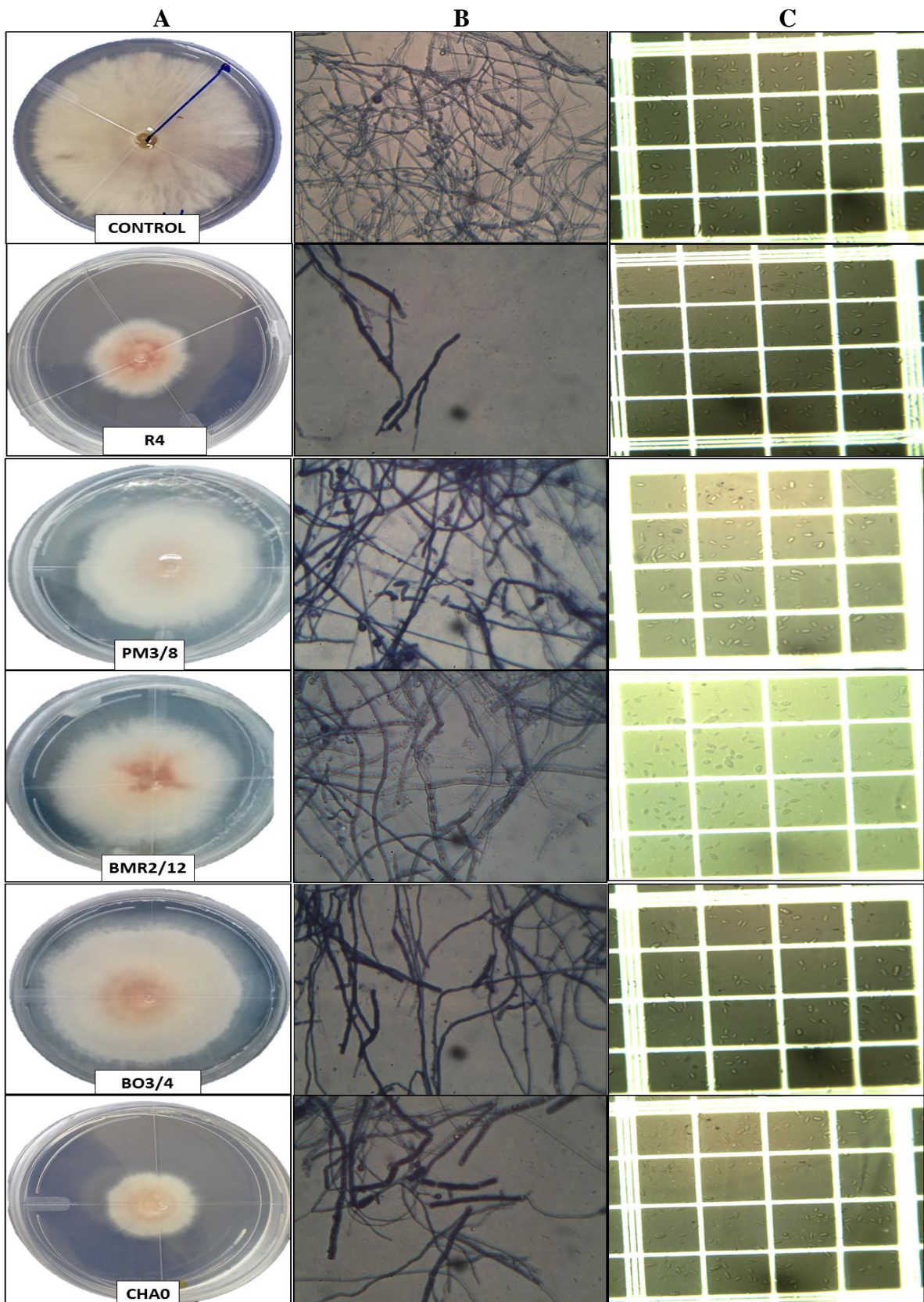


Figura 9: Potencial antagonista de sobrenadantes bacterianos sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1. Columna A) Inhibición del crecimiento micelial. Columna B) Degradación micelial bajo los tratamientos aplicados. Columna C) Inhibición del número de esporas después de la aplicación de sobrenadantes bacterianos.

4.2. Discusión

4.2.1. Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

La identificación de los agentes patogénicos causantes de enfermedades en la agricultura es de importancia para su control, por ello esta investigación se enfocó en la identificación morfológica y molecular de aislados fúngicos de FOCR1 obtenidos de distintas zonas. Se seleccionó a la provincia de Los Ríos y Guayas a sus condiciones agroclimáticas pueden favorecer la presencia de este patógeno, como lo indica Figueroa (2020) en su investigación realizada en Los Ríos y que consistió en infectar plantas de banano Gros Michel con FOCR1 y la aplicación de un protocolo de contención en una plantación, de tal forma que el hongo se adaptó de manera efectiva en la zona. Boyd *et al.* (2013) manifiestan que la identificación de fitopatógenos es uno de los enfoques de investigación indispensable en la búsqueda de estrategias agronómicas de control y manejo de la enfermedad, esto coincide con uno de los objetivos planteados en esta investigación.

Dentro de la investigación se aislaron 16 cepas fúngicas con características en comunes y también características distintas, siendo la coloración micelial la principal. Se utilizó el medio PDA y en este medio las pigmentaciones que se llegaron a apreciar fueron desde blancas, con distintas tonalidades entre amarillas, pardas, melón, violetas y rosáceas. Estas características coinciden con lo reportado por Lara (2009), quien observó pigmentaciones violetas, pardas y blancas en las cepas aisladas de FOCR1, de igual manera, Salas (2015) observó micelio algodonoso desde blanco hasta el tono violeta pardo en sus aislados.

En los estudios dirigidos por Ploetz (2006) se indica que la coloración no es una característica diferenciable en el género *Fusarium*, esto se comprueba con el estudio de Hernández *et al.* (2019) quien aisló *F. oxysporum* en el cultivo de *Capsicum annumm* L. Leslie y Summerell (2008) también manifiestan que se deben considerar otras características para la diferenciación entre especies del género *Fusarium*. El cambio de color en los aislados se debe a varios factores, tales como la alta variabilidad genética que presenta el género *Fusarium*, al tipo de medio en el cual se ha incubado, al tiempo de incubación, condiciones de luminosidad, el estrés causado por la deficiencia de nutrientes.

La mayoría de los aislados obtenidos producían olor aromático similar a algunos aldehídos. Resultados similares fueron obtenidos por Darce (2013); Lara (2009) y Ploetz (2006) quienes clasificaron los aislamientos de FOCCR1 extraídos de plantas enfermas del cultivar Gros Michel en el grupo Odoratum. De acuerdo a Batlle y Pérez (2009) este carácter no está relacionado ni con las razas patogénicas ni con la producción de pigmentos, pero si es una característica diferenciable de otras especies de *Fusarium*, por lo tanto en este estudio se tomó en consideración como una variable de estudio.

Respecto a la forma de las estructuras reproductivas (macro y microconidias) y de resistencias (clamidosporas) coincidió con lo realizado por Palacios (2020), quien observó macroconidias ligeramente curvas y microconidias ovaladas. Ploetz (2006) manifiesta que las microconidias son de $5 \text{ a } 16 \times 2.4 \text{ a } 3.5 \mu\text{m}$, de forma ovalada a renal. Las macroconidias son de $27 \text{ a } 55 \times 3.3 \text{ a } 5.5 \mu\text{m}$, con forma de hoz y a veces ligeramente curvas. Las clamidosporas terminales e intercalares tienen entre $7 \text{ a } 11 \mu\text{m}$ de diámetro. Esto coincide con la investigación realizada, hay que considerar la variación climática, esto podría ser un factor limitante para el desarrollo de las distintas estructuras reproductivas y de resistencia, se determinó que las clamidosporas se encontraban en parejas o individualmente, intercaladas o en la parte terminal de las hifas, coincidiendo con Davis (2005) y Lara (2009).

Palacios (2020), en su estudio del aceite ozonizado sobre el crecimiento radial de FOCCR1 determinó crecimiento radial en promedio entre 3.3 y 3.9 cm de radio a los 15 días, en esta investigación se tuvieron promedios entre 2.8 y 3.8 cm a los 15 días, esto debido a que las zonas climáticas no tienen mayores diferencias. Al ser FOCCR1 un hongo que no puede ser distinguido morfológicamente de otras especies de *Fusarium*, se procedió a realizar una identificación molecular, en base al ADNg. Concordando con Garcés *et al.* (2001), quienes indican que para la identificación de las formas especiales y razas patogénicas se recomienda realizarla mediante técnicas moleculares tales como DNA fingerprint, RFLPs, RAPDs y PCR. Por lo tanto, la descripción macroscópica y microscópica del hongo fitopatógeno no es suficiente para la identificación de las formas especiales y razas patogénicas de FOC. Rita *et al.* (2013) coinciden que en la identificación de microorganismos la morfología es la base de la identificación hasta género, especie, familia, orden.

Sin embargo, las variedades dentro de una especie tienen que ser identificadas usando características como patogenicidad, bioquímica, propiedades inmunológicas, o secuencias

de nucleótidos del ADN genómico. En la identificación molecular se utilizaron los cebadores ITS1 y ITS4 que generaron un fragmento específico de 600 pb para FOCCR1, coincidiendo con lo descrito por Leong *et al.* (2009), quien aisló el patógeno y lo identificó molecularmente. El uso de cebadores específicos también ha permitido identificar *Moniliophthora perniciososa* aislada de *Theobroma cacao* (biotipo C), presentando dos grupos, Grupo I compuesto de siete ecotipos con una variación de pesos moleculares entre 802 a 872 pb y Grupo II compuesto de cinco ecotipos con una variación de pesos moleculares entre 701 a 797 pb (Auhing, 2018). Por lo tanto, el uso de cebadores como los utilizados en esta investigación permite la identificación de agentes fitopatogénicos, siendo una herramienta usada mucho en la actualidad y que permite determinar el patógeno de manera específica.

4.2.2. Evaluación del efecto inhibitorio de los sobrenadantes bacterianos

En esta investigación se determinó que las cepas R4 y CHA0 inhibían en gran porcentaje el crecimiento micelial y la producción de esporas de FOCCR1, *P. veronii* R4 inhibe el crecimiento del micelio en un 62.22 % y *P. protegens* CHA0 un 51.85 % esto por la capacidad que la cepa R4 tiene de producir 2,4-Diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), un metabolito que provoca la ruptura de la pared celular. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Cedeño (2018), quien señala que *P. veronii* R4 alcanzó el mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Phytophthora palmivora* con promedio superior al 78 %, de igual forma *P. protegens* CHA0 alcanzó un 60.51 % de inhibición.

Es destacable además que en los estudios de Cedeño (2018) las bacterias *S. marcescens* PM3/8 y *A. calcoaceticus* BMR2/12 alcanzaron promedios inhibitorios de 61.85 y 71.38 % respectivamente. Pero en esta investigación sus promedios fueron de 19.26 y 20.74 % respectivamente, al utilizar sobrenadantes se puede perder la eficacia de los metabolitos que los componen, además FOCCR1 es un hongo perteneciente a los ascomicetes, mientras que *P. palmivora* no se considera un hongo verdadero, posiblemente influyó la composición de las paredes celulares, en *P. palmivora* la pared celular está compuesto por celulosa y en FOCCR1 está compuesta por quitina. Villa *et al.* (2005) observaron que las cepas de *Pseudomonas* inhiben el crecimiento micelial del hongo *Sclerotium rolfsii* entre el 60 y 90 %, éste con la excreción de sideróforos los cuales forman parte de los mecanismos de control de las enfermedades causadas por hongos y bacterias fitopatógenas por la competencia con

el ión férrico donde forman quelatos con éstos y causan inhibición al patógeno por no disponer de éste. Otros estudios reportan que la aplicación de R4 y CHA0 provoca los más altos porcentajes de control del nematodo *Meloidogyne incognita* en estadio J2 a las 24 horas de aplicación con un 76,5 % de control cada una (Rodríguez, 2018).

Al evaluar la inhibición del número de esporas se determinó que el porcentaje de inhibición de número de esporas fue mayor en para *P. veronii* R4 y también para *P. protegens* CHA0 con porcentajes de 54.1 % y 45.3 % respectivamente, los demás tratamientos presentaron valores entre 33.7 % y 38.2 %. Auhing (2018) obtuvo el 46.11 % de inhibición hacia la germinación de basidiosporas y el tubo germinal de *M. perniciososa*. Con la utilización de *P. protegens* CHA0, esto se complementa por lo manifestado por Altamira (2017), quien manifiesta que *P. veronii* R4 ejerce actividad antagonista sobre distintos patógenos y que está mediada por la secreción de la proteasa extracelular AprA y de los metabolitos secundarios, HCN (cianuro de hidrógeno) y 2,4-DAPG. Lara (2009), utilizó bacteria endofíticas, las cuales ocasionaron un menor crecimiento radial de los tres aislamientos de FOC, mientras que el efecto de otras difiere con cada aislamiento de FOC.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se realizaron análisis morfológicos y moleculares a los aislados fúngicos de muestras de tejido vegetal obtenidos de plantaciones de Gros Michel en las provincias del Guayas y Los Ríos, identificando 16 cepas de FOCCR1 en el área de estudio.
- Se identificó a FOC 1-4, proveniente de la provincia de Los Ríos, como la cepa con mayor capacidad patogénica de las cepas aisladas, en relación con el crecimiento micelial y número de esporas.
- Los valores alcanzados en los ensayos de inhibición de FOCCR1 por los sobrenadantes bacterianos de las cepas R4 y CHA0 alcanzaron porcentajes de 62.22 % y 51.85 % de inhibición en el crecimiento micelial del hongo en estudio, y de igual forma estas mismas cepas redujeron el número de esporas en un porcentaje de 54.1 % y 45.3 % respectivamente.

5.2. Recomendaciones

- Realizar muestreos y aislamientos de cepas de FOCR1 de otras zonas con diferentes características agroclimáticas para evaluar el comportamiento del hongo en relación con el ambiente de desarrollo.
- Conservar las cepas aisladas de FOCR1 en el banco de germoplasma del laboratorio de microbiología y biotecnología molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, para posteriores estudios.
- Se recomienda utilizar las cepas bacterianas que presentaron alto porcentaje de inhibición para FOCR1 en esta investigación, para ensayos a nivel de campo.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5th edition. New York, United States: Elsevier.
- AGROCALIDAD. 2016. Recomendaciones para prevenir el ingreso de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Raza 4 Tropical. 1-2. Disponible en <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/foc11.pdf>.
- Altamira, F. 2017. Bases moleculares de la actividad biocontroladora de la bacteria *Pseudomonas veronii* R4 sobre el nemátodo *Xiphinema index*. Tesis Doctoral, Universidad Técnica Federico Santa María. Pontificia Universidad Católica De Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- ARCOBANEC. 2020. Analisis de las exportaciones de banano de enero a abril del 2020. Ecuador. Asociación de comercialización y exportación de banano (ACORBANEC).
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P., y Pilkauskas, P. 2004. La Economía Mundial del Banano 1985-2002. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
- Auhing, J. 2018. Biodiversidad de ecotipos y rangos de agresividad de *Moniliophthora perniciosa*, en *Theobroma cacao* L., y el efecto antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPRs'). Tesis, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- Bach, T., Díaz, M., Ferreira, A., y Laurent, A. 2007. Estudio de las características de promoción del desarrollo vegetal de *Pseudomonas fluorescens* utilizada en el biofertilizante Rizofos. Córdoba, Argentina.
- Bashan, Y., y Dubrovsky, J. 1996. *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. *Biology and Fertility of Soils* 23(4):435-40. doi: 10.1007/BF00335919.
- Bashan, Y., y Holguin, G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30(8-9):1225-28.
- Battle, A., y Pérez, L.. 2009. Genetic Variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* populations in Cuban Plantains and Bananas. *Fitosanidad* 13(3):169-86.

- Boyd, L., Ridout, C., O'Sullivan, D., Leach, J., y Leung, H.. 2013. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. Elsevier Ltd.
- Caballero, A., Pocasangre, L., Casanoves, F., Avelin, J., Tapia, A., y Ortiz, J. 2013. Uso de aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., para el biocontrol del *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Mal de Panamá) raza 1 en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) en condiciones de invernadero. Universitas (León): Revista Científica de la UNAN León 4(1):71-82. doi: 10.5377/universitas.v4i1.1676.
- Camelo, M., Vera, S., y Bonilla, R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria 12(2):159-66. doi: 10.21930/rcta.vol12_num2_art:227.
- Cañedo, V., y Ames, T. 2004. Manual de Laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Cedeño, A.. 2018. Identificación molecular de *Phytophthora* spp, mediante el empleo de marcadores moleculares(ITS)., y efecto antagonista de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Tesis, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- Darce, A. 2013. Evaluación de la agresividad de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 causante de la enfermedad Mal de Panamá en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero. Tesis de Grado, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua - León, Nicaragua.
- Davis, R. 2005. Fusarium wilt (Panama disease) of banana. Oceanía: Pest Advisory Leaflet No 42. Secretariat of the Pacific Community.
- Dita, M., Echegoyén, P., y Pérez, L. 2013. Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en un país de la región del OIRSA. Primera ed. San Salvador, El Salvador: Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., y Okon, Y. 2003. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences 22(2):107-49. doi: 10.1080/713610853.
- Elbehri, A., Calberto, G., Staver, C., Hospido, A., Roibas, L., Skully, D., Siles, P., Arguello,

- J., Sotomayor, I., y Bustamante., A. 2015. Cambio climático y sostenibilidad del banano en el Ecuador: Evaluación de impacto y directrices de política. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
- EPPO. 2020. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FUSACB). Disponible en <https://gd.eppo.int/taxon/FUSACB>.
- Figuroa, W.. 2020. Capacidad de infección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 en el cultivar de banano Gros Michel (Musa AAA). Tesis, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G., y Valencia, H. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana 6(1):7-25.
- Garrido, E., Hernández, E., y Noriega, D. 2011. Manual de producción de banano para la región del Soconusco. Estrategias para el Manejo de la Sigatoka Negra. Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
- Hernández, A., Pineda, A., y Noriega, H.. 2019. Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de «ají paprika» *Capsicum annumm* L. (Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú. Arnaldoa 26(2):689-98. doi: 10.22497/arnaldoa.262.26211.
- Hernández, L., y Escalona, M. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. Revista de divulgación científica y tecnologica de la Universidad Veracruzana 16(1):Online.
- INIAP. 2011. Banano, plátano y otras musáceas. Disponible en <http://www.iniap.gob.ec/pruebav3/banano-platano-y-otras-musaceas/>.
- Karimi, K., Amini, J., Harighi, B., y Bahramnejad, B. 2012. Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against Fusarium wilt of chickpea. Australian Journal of Crop Science 6(4):695-703.
- Kloepper, J., Ryu, C., y Zhang, S. 2004. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. Phytopathology® 94(11):1259-66. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259.

- Lara, D. 2009. Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) en el cultivar Gros Michel (AAA). Tesis de Maestría, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
- Leong, S., Latiffah, Z., y Baharuddin, S. 2009. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense of banana. American Journal of Applied Sciences 6(7):1301-7.
- Leslie, J., y Summerell, B. 2008. The Fusarium laboratory manual. Iowa, United States: John Wiley & Sons.
- Martínez, L., y Valencia, H. 2016. Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) raza 4 Tropical (Foc R4T). Ficha Técnica N° 2. Vol. 2. Ciudad de México, México: SENASICA. Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria.
- Ortíz, V., y López, M. 2011. El Cultivo del Banano. Primera ed. San José, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia (EUNED).
- Palacios, E. 2020. Efecto de aceite ozonizado sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical 1 (FOC-RT1). Tesis, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- Peña, H., y Reyes, I. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). Interciencia 32(8):560-65.
- Pérez, V., Dita, M., y Martínez, E. 2014. Technical Manual: Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4(TR4). Vol. 4. Roma, Italia: FAO.
- Ploetz, R. 1994. Panama disease: Return of the first banana menace. International Journal of Pest Management 40(4):326-36. doi: 10.1080/09670879409371908.
- Ploetz, R. 2006. Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. Phytopathology® 96(6):653-56. doi: 10.1094/PHYTO-96-0653.
- Ploetz, R., y Pegg, K. 2000. Fusarium Wilt. Pp. 143-59 en Handbook of Diseases of Banana,

- Abacá and Enset, editado por D. Jones. Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing.
- QIAGEN. 2016. DNeasy® Plant Mini Kit. Quick start protocol (March):1-2.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., y Samiyappan, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20(1):1-11.
- Rita, W., Suprpta, D., Sudana, I., y Swantara, I. 2013. First Report on *Fusarium solani* , a Pathogenic Fungus Causing Stem Rot Disease on Dragon Fruits (*Hylocereus* sp .) in Bali. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 3(17):93-100.
- Riveros, F., Muñoz, G., González, L., Rojas, L., Alvarez, M., y Hinrichsen, P. 2001. Comparación entre análisis morfológicos y de ADN para la identificación de especies de *Fusarium* aislados de melón (*Cucumis melo* L.). *Agricultura Técnica* 61(3):281-93.
- Rodríguez, J.. 2018. Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia *Meloidogyne incognita* «*in vitro*». Tesis, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- Salas, Verónica Alexandra. 2015. Determinación del antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp. aislado del suelo de los cultivos de banano de la región costa del ecuador frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 1. Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Pichincha, Ecuador.
- Shah, J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12(4):459-64. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.011.
- Sivamani, E., y Gnanamanickam, S. 1988. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp.*cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil* 107(1):3-9. doi: 10.1007/BF02371537.
- Soto, M. 2008. Banano Técnicas de Producción, Manejo, Poscosecha y Comercialización. Tercera ed. Costa Rica: Litografía e Imprenta LIL.
- Sotomayor, I. 2012. La raza tropical 4 del mal de Panamá: Amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador. Quevedo, Ecuador: Boletín Divulgativo no. 418. INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Programa Nacional de Banano, Plátano y Otras Musáceas.

- Stover, R. 1959. A rapid and simple pathogenicity test for detecting virulent clones of *Fusarium oxysporum* f. *cubense* using seedlings of *Musa balbisiana*. *Nature* 184(4):1591-92.
- Swain, M., y Ray, R. 2009. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research* 164(2):121-30.
- Tazán, L. 2003. El cultivo de plátanos en Ecuador. Guayaquil, Guayas, Ecuador: Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Editorial Raíces.
- Tejera, B., Heydrich, M., y Rojas, M. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal* 27(2):117-22.
- Torres, S. 2012. Guía práctica para el manejo de banano orgánico en el valle del Chira. Primera ed. Piura, Perú: Proyecto Norte Emprendedor - Swisscontact.
- Vargas, A., Watler, W., Morales, M., y Vignola, R. 2017. Ficha técnica cultivo de banano. Vol. 2. San José, Costa Rica: CATIE. Corporación Bananera Nacional-CORBANA. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).
- Vézina, A., y Baena, M. 2020. Morfología de la planta del banano. Promusa. Disponible en <https://www.promusa.org/Morfología+de+la+planta+del+banano>.
- Villa, P., Frías, A., y González, G.. 2005. Evaluación de cepas de *Pseudomonas* sp para el control de hongos fitopatógenos que afectan a cultivos de interés económico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 39(3):40-44.
- Wallace, G. 1952. Wilt or Panama Disease of Banana. *The East African Agricultural Journal* 17(4):166-75. doi: 10.1080/03670074.1952.11664805.
- Weller, D. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26(1):379-407. doi: 10.1146/annurev.py.26.090188.002115.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-22 en *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*, editado por D. Gelfand, J. Sninsky, y T. White. New York, United States: Elsevier. Academic Press, Inc.

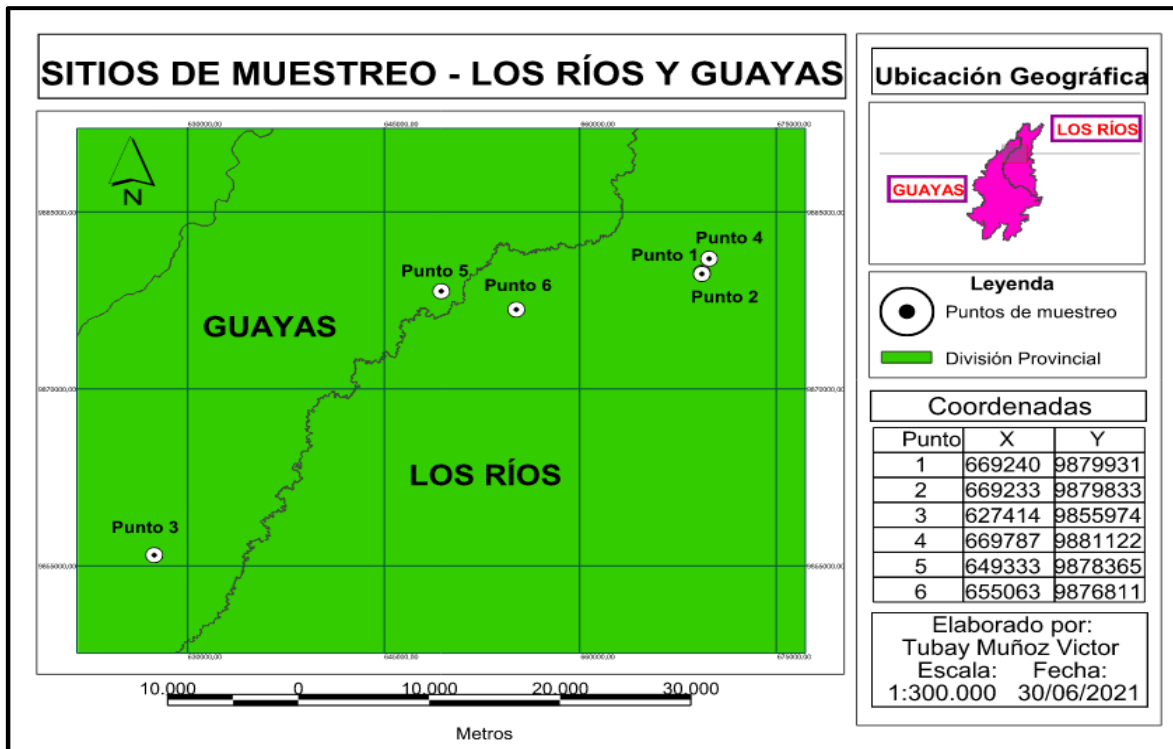
Wu, K., Chen, W., Yang, S, Wen, Y., Zheng, Y., Anjago, W., Yun, Y., y Wang, Z. 2019. Isolation and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Fujian Province, China. *Journal of Integrative Agriculture* 18(8):1905-13. doi: 10.1016/S2095-3119(18)62149-5.

CAPÍTULO VII

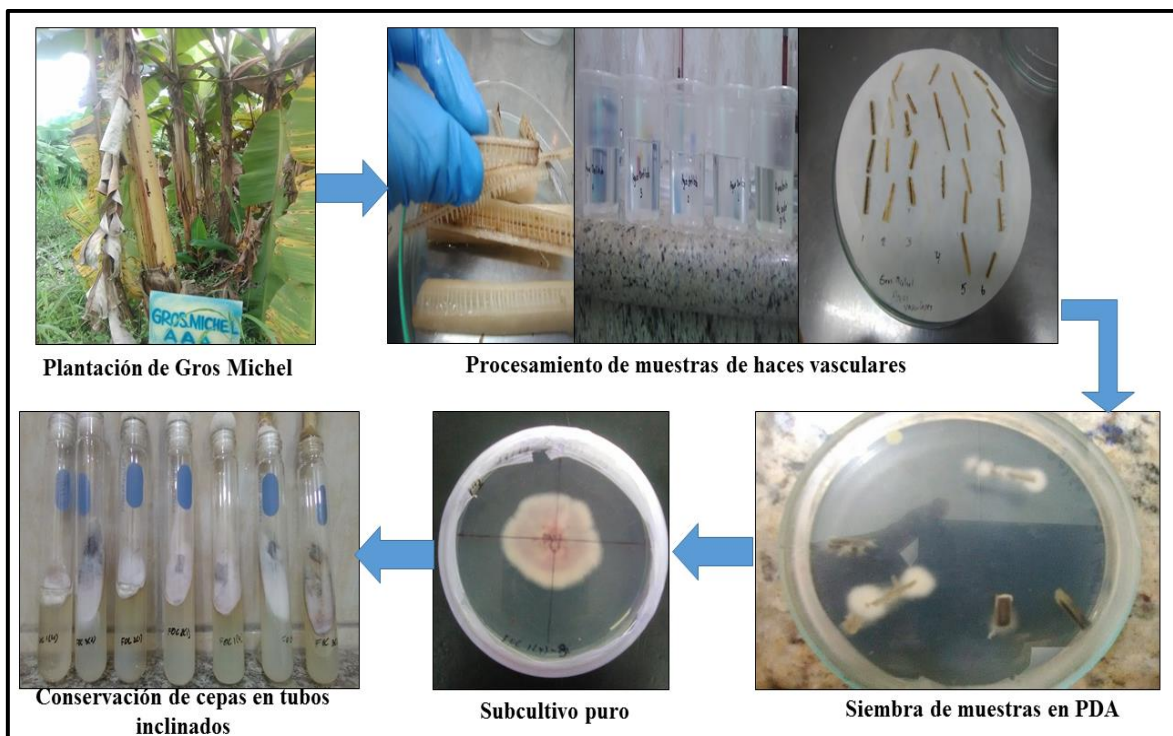
ANEXOS

7.1. Anexos

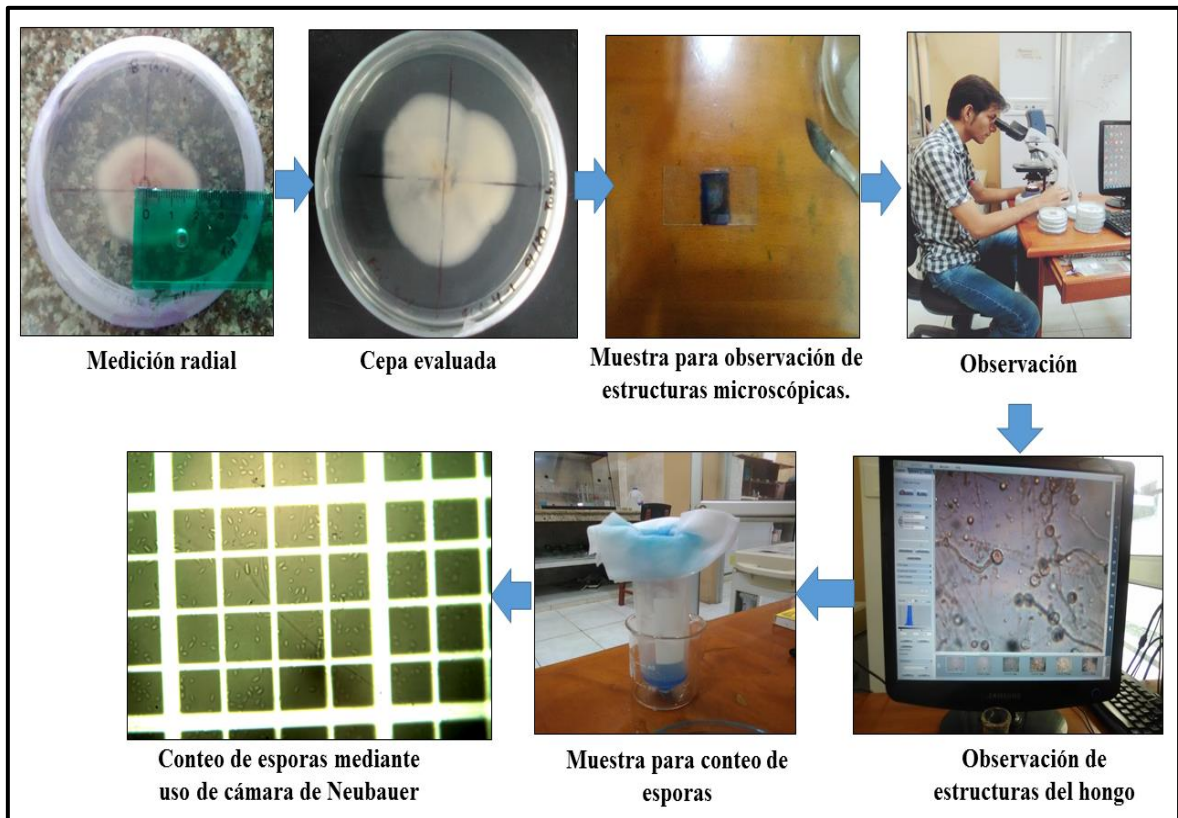
Anexo 1: Sitios de recolección de muestras de tejido vegetal de plantas con sintomatología característica de mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1



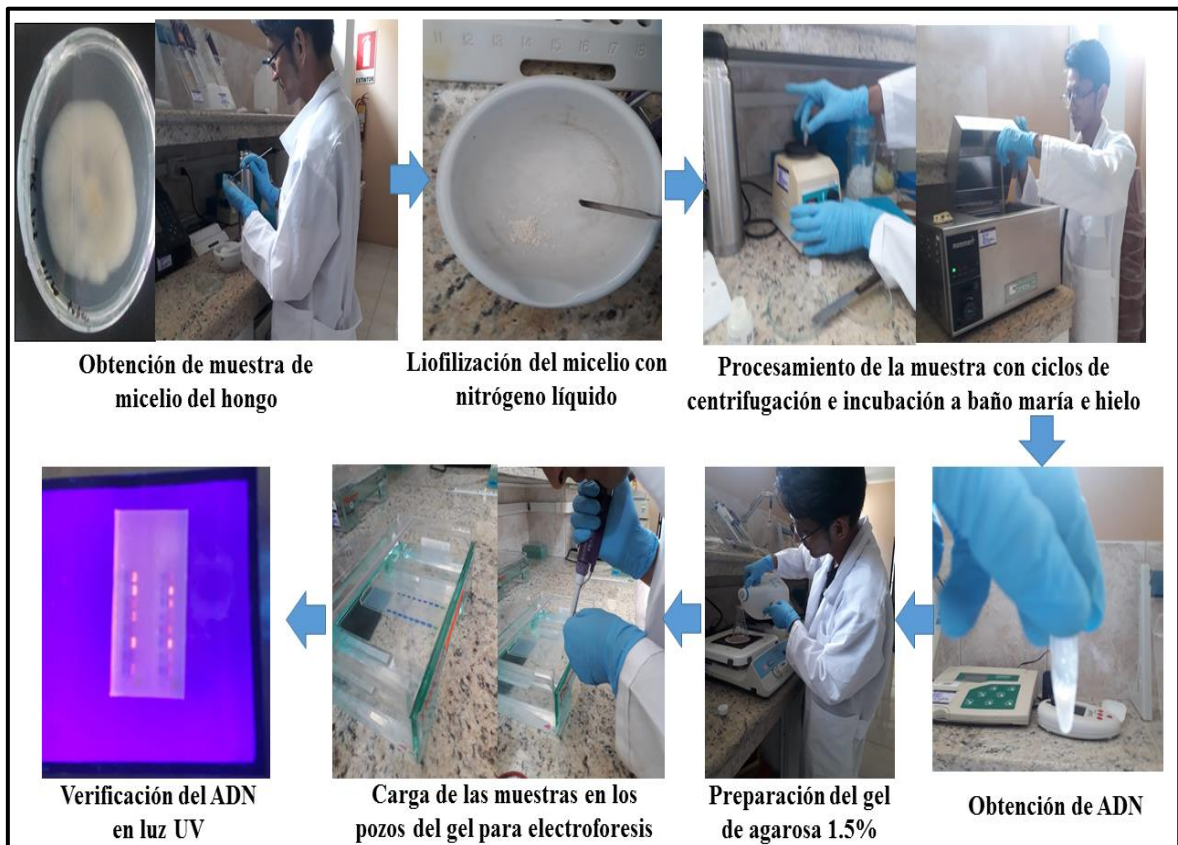
Anexo 2: Aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 a partir de tejido vegetal infectado (haces vasculares).



Anexo 3: Observación de estructuras macroscópicas y microscópicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1.



Anexo 4: Obtención de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1.

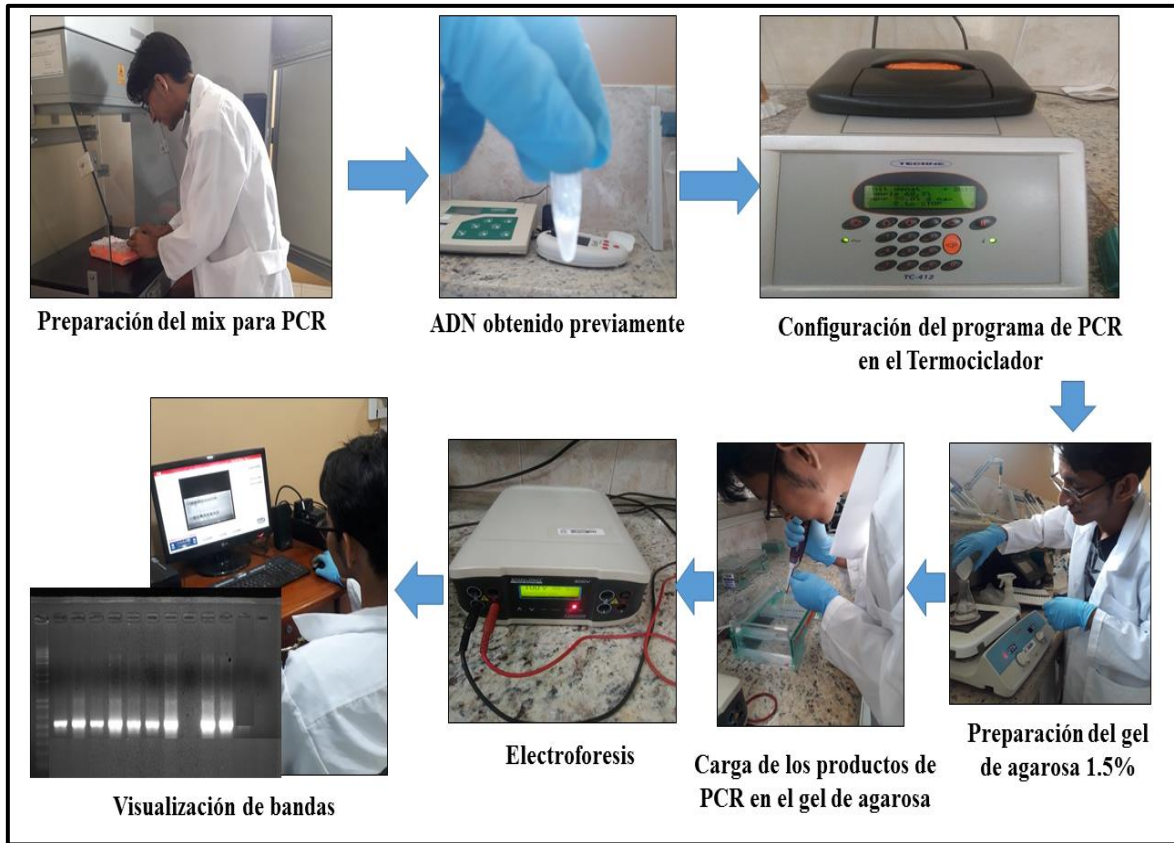


Anexo 5: Protocolo del DNeasy® Plant Mini Kit.

Notas antes de comenzar:

- Realice todos los pasos de centrifugación a temperatura ambiente (15–25 ° C).
 - Si es necesario, vuelva a disolver los precipitados en los concentrados de Buffer AP1 y Buffer AP3 / E.
 - Añada etanol a los concentrados Buffer AW y Buffer AP3 / E. Precaliente un baño de agua o un bloque calefactor a 65 ° C.
1. Romper las muestras (≤ 100 mg de peso húmedo o ≤ 20 mg de tejido liofilizado) usando el TissueRuptor®, el TissueLyser o un mortero con mano.
 2. Añada 400 μ l de tampón AP1 y 4 μ l de ARNasa A. Agite en el vórtex e incube durante 10 min a 65 ° C. Invierta el tubo 2-3 veces durante la incubación. Nota: No mezcle Buffer AP1 y RNase A antes de usar.
 3. Añada 130 μ l de tampón AP2. Mezclar e incubar durante 5 min en hielo.
 4. Recomendado: Centrifugue el lisado durante 5 min a 20.000 x g (14.000 rpm).
 5. Pipetee el lisado en una columna giratoria QIAshredder colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar durante 2 min a 20.000 x g.
 6. Transfiera el flujo continuo a un tubo nuevo sin alterar el gránulo si está presente. Añada 1,5 volúmenes de Tampón AP3 / E y mezcle pipeteando.
 7. Transfiera 650 μ l de la mezcla a una columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recogida de 2 ml. Centrifugar durante 1 min a ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Deseche el flujo continuo. Repita este paso con la muestra restante.
 8. Coloque la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. Añada 500 μ l de tampón AW y centrifugue durante 1 min a ≥ 6000 x g. Deseche el flujo continuo.
 9. Agregue otros 500 μ l de tampón AW. Centrifugar durante 2 min a 20.000 x g. Nota: Retire la columna de centrifugado del tubo de recolección con cuidado para que la columna no entre en contacto con el flujo continuo.
 10. Transfiera la columna de centrifugación a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml.
 11. Añada 100 μ l de tampón AE para la elución. Incube durante 5 min a temperatura ambiente (15–25 ° C). Centrifugar durante 1 min a ≥ 6000 x g.
 12. Repita el paso 11 (QIAGEN, 2016).

Anexo 6: Realización de PCR a partir de ADN para la identificación molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1.



Anexo 7: Cepas bacterianas utilizadas en la investigación.

