



**REPÚBLICA DEL ECUADOR**

**UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO**

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE:**

**MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DEL *BACILLUS SPP.*  
EN EL MANEJO DE SIGATOKA NEGRA EN *MUSA PARADISIACA L.*, *IN SITU.***

**Autor:**

**ING. ROBERT OMAR YÉPEZ ALVARADO**

**ING. IVANA ALEXANDRA ARMIJOS GALARZA**

**Director:**

**MSc. KAREN RODAS PAZMIÑO**

*Milagro, 2024*

## Derechos de autor

**Sr. Dr.**

**Fabricio Guevara Viejó**

Rector de la Universidad Estatal de MilagroPresente.

Yo, **Ing. Ivana Alexandra Armijos Galarza** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magisteren Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación **Agrobiotecnología** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatalde Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercialde la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual,de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su formade expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 4 de febrero de 2024



Firmado electrónicamente por:  
**IVANA ALEXANDRA  
ARMIJOS GALARZA**

**Ivana Alexandra Armijos Galarza**

**C.I.: 0705160877**

## Derechos de autor

**Sr. Dr.**

**Fabricio Guevara Viejó**

Rector de la Universidad Estatal de MilagroPresente.

Yo, **Ing. Robert Omar Yépez Alvarado** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magisteren Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación **Agrobiotecnología** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatalde Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercialde la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual,de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su formade expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 4 de febrero de 2024



Firmado electrónicamente por:  
**ROBERT OMAR  
YEPEZ ALVARADO**

**Robert Omar Yépez Alvarado**

**C.I.: 0913604716**

## Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Yo, **MSc. Karen Alexandra Rodas Pazmiño** en mi calidad de directora del trabajo de titulación, elaborado por **Ivana Alexandra Armijos Galarza y Robert Omar Yépez Alvarado** cuyo tema es Evaluación de la actividad antagónica del *Bacillus* spp. en el manejo de Sigatoka Negra en *Musa paradisiaca* L., *in situ*, que aporta la Línea de Investigación **Agrobiotecnología**, previo a la obtención del GradoMagister en biotecnología, Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 4 de febrero de 2024



Firmado electrónicamente por:  
**KAREN ALEXANDRA  
RODAS PAZMIÑO**

**MSc. Karen Alexandra Rodas Pazmiño**

**C.I.: 0923486484**

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**DIRECCIÓN DE POSGRADO**  
**CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA**

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. ARMIJOS GALARZA IVANA ALEXANDRA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DEL BACILLUS SPP. EN EL MANEJO DE SIGATOKA NEGRA EN MUSA PARADISIACA L., IN SITU.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.00
SUSTENTACIÓN	39.67
PROMEDIO	98.67
EQUIVALENTE	Excelente



YESSSENIA BEATRIZ  
SARANGO ORTEGA

Munabmm SARANGO ORTEGA YESSSENIA BEATRIZ  
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



JOSE HUMBERTO VERA  
RODRIGUEZ

Mgs VERA RODRIGUEZ JOSÉ HUMBERTO  
VOCAL



MARIA FERNANDA  
GARCES MONCAYO

Msc GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA  
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**DIRECCIÓN DE POSGRADO**  
**CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA**

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. YEPEZ ALVARADO ROBERT OMAR**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DEL BACILLUS SPP. EN EL MANEJO DE SIGATOKA NEGRA EN MUSA PARADISIACA L., IN SITU.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.00
SUSTENTACIÓN	39.67
PROMEDIO	98.67
EQUIVALENTE	Excelente



Yessenia Beatriz  
Sarangó Ortega

Munabmm SARANGÓ ORTEGA YESSENIA BEATRIZ  
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Jose Humberto Vera  
Rodriguez

Mgs VERA RODRIGUEZ JOSE HUMBERTO  
VOCAL



María Fernanda  
Garcés Moncayo

Msc GARCÉS MONCAYO MARÍA FERNANDA  
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

## **DEDICATORIA**

Esta tesis está dedicada a mi querida familia, mi esposa e hijos son la fuerza que me impulsa a esforzarme cada día en busca de logros personales como profesionales.

**Robert Omar Yépez Alvarado**

A mi familia, pilar fundamental en este camino de estudio. Gracias por su amor constante, paciencia infinita y por ser mi inspiración cada día.

**Ivana Alexandra Armijos Galarza**

## **AGRADECIMIENTOS**

Un gran agradecimiento a la Universidad UNEMI por permitirme ser parte de esta maestría en Biotecnología, a los docentes que brindaron sus conocimientos de manera profesional.

También un inmenso agradecimiento a mi tutora de tesis Msc. Karen Rodas por su apoyo y dedicación en este trabajo y a mi amiga Ivana Armijos con quien comparto este proyecto de Biotecnología, gracias por su ayuda incondicional en todo momento.

**Robert Omar Yépez Alvarado**

Agradezco a Dios por permitirme alcanzar una de mis metas, otorgándome sabiduría y salud para concluir con éxito este trabajo de investigación. A mi familia, por su apoyo contante.

Expreso mi profundo agradecimiento a la Msc. Karen Rodas por su invaluable orientación, enseñanzas y disposición durante todo el proceso de elaboración de la tesis. También quiero reconocer a todas las personas que colaboraron en las diversas áreas de trabajo que hicieron posible la realización de esta investigación.

**Ivana Alexandra Armijos Galarza**

## Resumen

El cultivo de banano (*Musa* spp.) destaca como una actividad agrícola de gran importancia económica en Ecuador, su principal amenaza es Sigatoka negra una enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, reduciendo el rendimiento del cultivo hasta un 50% si no se aplica un manejo integrado de la enfermedad. Esta investigación tiene como objetivo evaluar la eficacia de la acción bactericida del *Bacillus* spp. en el manejo de Sigatoka Negra en el cultivo de *Musa paradisiaca* L., *in situ*. El estudio experimental está enfocado en dos escenarios, (a) laboratorio, (b) campo. Se procedió a purificar la cepa bacteriana en agar (BAS) identificándola morfológicamente a través de tinción de Gram y asegurarnos de seleccionar la colonia adecuada para aislar la cepa bacteriana en caldo LB y proceder con la caracterización y cuantificación del estudio metagenómico. La secuenciación del gen 16 ARNr identifico 384 clasificaciones a nivel de especie, encontrando 96.98% de especies sin clasificar, BA con 1.19% mientras que otras especies están por debajo del 1%. El diseño experimental en campo se empleó un DBCA conformado por 5 tratamientos y 3 repeticiones evaluando las variables de severidad STOVER (%), área foliar afectada durante todo el tiempo en estudio, donde se cumplió la hipótesis planteada, la dosis de T4 *Bacillus* spp., tiene un control preventivo del 80% hacia SN. Los resultados sugieren al biofungicida con una dosis de 1.5 L/ha como una alternativa viable para el control preventivo de sigatoka negra en el cultivo de banano.

**Palabras claves:** *Bacillus* spp., Sigatoka negra, estudio metagenómico, biofungicida.

## Abstract

The banana crop (*Musa* spp.) stands out as an agricultural activity of great economic importance in Ecuador; its main threat is Black Sigatoka, a disease caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, reducing crop yields by up to 50% if integrated management of the disease is not applied. The objective of this research is to evaluate the efficacy of the bactericidal action of *Bacillus* spp. in the management of Black Sigatoka in *Musa paradisiaca* L., *in situ*. The experimental study is focused on two scenarios, (a) laboratory, (b) field. We proceeded to purify the bacterial strain on agar (BAS) identifying it morphologically through Gram staining and making sure to select the appropriate colony to isolate the bacterial strain in LB broth and proceed with the characterization and quantification of the metagenomic study, having as results that the Sanger method was not feasible due to the presence of more microorganisms in the sample. Sequencing of the 16 rRNA gene identified 384 species-level classifications, finding 96.98% of species unclassified, BA with 1.19% while other species are below 1%. A metagenomic study of the bioproduct is recommended to know the genus and species, due to the high % without classification. The hypothesis was fulfilled, the dose of T4 *Bacillus* spp., has a preventive control of 80% towards SN, considering the biofungicide as a viable alternative for the banana crop. It is suggested to perform an *in vitro* seeding comparing the different doses of the bioproduct to compare the laboratory results with those observed in the field.

**Key words:** *Bacillus* spp., Black Sigatoka, metagenomics study, biofungicida.

## Lista de Figura

<b>Figura 1</b> .....	44
Diagrama de proceso de siembra y aislamiento de la cepa <i>Bacillus</i> spp.....	44
<b>Figura 2</b> .....	45
Diagrama del proceso de establecimiento de la plantación y las evaluaciones de la aplicación del bioproducto.....	45
<b>Figura 3</b> .....	48
Fotos del proceso de siembra de la bacteria <i>Bacillus</i> spp. ....	48
<b>Figura 4</b> .....	49
Fotos de coloración de Gram.....	49
<b>Figura 5</b> .....	52
Grados de Severidad de Sigatoka negra .....	52
<b>Figura 6</b> .....	52
Representación de los estados de desarrollo de la hoja cigarro en el cultivo de banano. ....	52
<b>Figura 7</b> .....	54
Parcelas experimentales .....	54
<b>Figura 8</b> .....	55
Identificación morfológica de <i>Bacillus</i> spp.....	55
<b>Figura 9</b> .....	58
Resultados de clasificación de reinos .....	58
<b>Figura 10</b> .....	59
Clasificación de rayos solares del reino Bacteria.....	59
<b>Figura 11</b> .....	60
Cronograma de electroforesis capilar.....	60
<b>Figura 12</b> .....	62
Índice de infección de Sigatoka negra a los 0 DDA.....	62

<b>Figura 13</b> .....	63
Índice de infección de Sigatoka negra a los 13 DDA.....	63
<b>Figura 14</b> .....	63
Índice de infección de Sigatoka negra a los 28 DDA.....	63
<b>Figura 15</b> .....	64
Índice de infección de Sigatoka negra a los 34 DDA.....	64
<b>Figura 16</b> .....	65
Índice de infección de Sigatoka negra a los 44 DDA.....	65
<b>Figura 17</b> .....	66
Porcentaje de área foliar afectada por Sigatoka negra .....	66
<b>Figura 18</b> .....	67
Comportamiento de las temperaturas y lluvias en el sitio de estudio .....	67
<b>Figura 19</b> .....	68
Emisión foliar de cada uno de los tratamientos.....	68

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1</b> .....	49
Distribución de los tratamientos .....	49
<b>Tabla 2</b> .....	50
Mezclas de los tratamientos evaluados.....	50
<b>Tabla 3</b> .....	56
Información de la muestra <i>Bacillus</i> spp.....	56
<b>Tabla 4</b> .....	56
Identificación molecular de <i>Bacillus</i> spp.....	56
<b>Tabla 5</b> .....	57
Principales categorías taxonómicas a nivel de género <i>Bacillus</i> spp .....	57
<b>Tabla 6</b> .....	61
Prueba de ANOVA de los índices de infección de Sigatoka Negra (%). .....	61

## Lista de Abreviaturas

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ANDRA:** análisis de Restricción del ADNr Ribosomal 16S Amplificado.

**AFA:** área foliar afectada

**APs:** anilino pirimidinas

**ARNr:** ARN ribosomal

**BA:** *Bacillus amyloliquefaciens*

**BAS:** agar sangre de Cordero

**BCMs:** benzimidazoles

**BS:** *Bacillus subtilis*

**DGGE:** electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

**DBCA:** diseño de bloques completamente al azar

**DMIs:** inhibidores de la desmetilación

**HT:** hojas Totales

**HLE:** Hoja libre de estría

**HMJA:** Hoja más joven afectada

**N:** nitrógeno

**NGS:** secuenciación de próxima generación

**PCR:** reaccion en la cadena de polimerasa

**Qils:** inhibidores internos de la quinona

**Qols:** inhibidores externos de la quinona

**SN:** sigatoka negra

**SDHIs:** inhibidores SDH

**RPCV:** rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

## Índice / Sumario

INTRODUCCIÓN .....	18
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN .....	20
1.1. Planteamiento del problema.....	20
1.2. Delimitación del problema .....	20
1.2.1. Espacio.....	21
1.2.2. Tiempo .....	21
1.2.3. Universo.....	21
1.3. Formulación del problema .....	21
1.4. Preguntas de investigación .....	21
1.5. Determinación del tema .....	22
1.6. Objetivo General .....	22
1.7. Objetivo Específicos .....	22
1.8. Hipótesis .....	22
1.8.1. Hipótesis General.....	22
1.8.2. Hipótesis Particular .....	22
1.9. Declaración de las variables .....	22
1.10. Justificación.....	23
1.11. Alcance y limitaciones .....	24
1.11.1. Alcance .....	24
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....	26
2.1. Antecedentes .....	26
2.2. <i>Musa paradisiaca</i> L.....	26
2.3. Enfermedades que afectan al cultivo de banano .....	27
2.3.1. Sigatoka Negra.....	27
2.3.2. Mal de Panamá raza tropical 4 .....	29
2.3.3. <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	30
2.4. Control químico de las enfermedades que afectan a los cultivos de <i>Musa spp.</i> .....	30

2.5. Efectos de las aplicaciones químicas en el cultivo.....	31
2.6. Efectos de los químicos en los humanos.....	32
2.7. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.....	33
2.7.1. Bioestimulante.....	35
2.7.2. Agentes de control biológico.....	35
2.8. Antecedentes del <i>Bacillus</i> spp.....	36
2.9. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	38
2.12. Tinción de GRAM.....	40
2.13. Sanger.....	40
2.14. Estudios metagenómicos.....	41
2.15. Mecanismos de los <i>Bacillus</i> spp.....	42
<b>CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO.....</b>	<b>44</b>
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	44
3.2. La población y la muestra.....	46
3.2.1. Características de la población.....	46
3.2.2. Delimitación de la población.....	46
3.2.3. Tipo de muestra.....	46
3.2.4. Proceso de selección de la muestra.....	46
3.2.5. Materiales.....	47
3.2.5.1. Material biológico.....	47
3.2.5.2. Equipos e instrumentos.....	47
3.2.5.3. Reactivos.....	47
3.3. Procedimientos de laboratorio.....	47
Se procedió a esterilizar los materiales de vidrio previo a la inoculación del bioproducto.	47
3.3.1.1. Medios de cultivo.....	48
3.3.1.2. Procedimientos de la siembra del microorganismo por extensión de superficie	48
3.3.2. Tamaño de la muestra.....	49
3.3.2.1. Procedimientos de campo.....	50

3.3.2.2. Parámetros evaluados en campo .....	51
3.4. Los métodos y las técnicas .....	53
3.4.1. Método Inductivo.....	53
3.4.2. Método de la observación .....	53
3.4.3. Método analítico y experimental.....	53
3.4.4. Área de investigación .....	53
3.5. Procesamiento estadístico de la información .....	54
<b>CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
4.1. Clasificación estadística del análisis morfológico.....	55
4.1.1. Análisis del estudio del marcador 16S ARNr.....	55
4.1.2. Clasificación por nivel taxonómico.....	57
4.1.3. Clasificación a nivel de Reino .....	58
4.1.4. Clasificación de Rayos Solares.....	58
4.1.5. Secuenciación de Sanger.....	59
4.2. Análisis de varianzas factorial entre grupos segmentados .....	61
4.2.1. Análisis de varianza ANOVA con la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ) .....	62
4.2.2. Variables climáticas y fenológicas del cultivo de banano.....	67
4.2.3. Variable de emsión foliar .....	68
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>70</b>
5.1. Conclusiones .....	70
5.2. Recomendaciones .....	71
6. Referencias.....	72

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de banano (*Musa* spp.) es considerado como una de las actividades agrícolas con mayor importancia económica en el Ecuador, aproximadamente representa el 2% del PIB general y un 35% aproximado del PIB agrícola del país (MCOMEX, 2017). FAO, (2022) informo que Ecuador registró alrededor de 6.8 millones de toneladas de fruta, siendo el principal exportador bananero a nivel mundial.

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, conocida como Sigatoka Negra, es un factor biótico capaz de provocar enfermedades a nivel foliar preeminente en términos de impacto económico; esta afección se distingue por su capacidad de reproducirse tanto sexual como asexual, siendo *Paracercospora fijiensis* la especie encargada de la reproducción asexual y su colonización de los tejidos foliares conduce a necrosis parcial o total, por consiguiente podría afectar la capacidad fotosintética y provocar madurez prematura en los frutos incluso hasta 50% del rendimiento del cultivo (Barrera et al., 2016).

El uso de productos biológicos en los últimos años ha aumentado a gran escala y comienzan a reemplazar de cierta forma el uso de compuestos organofosforados, siendo una alternativa viable para el control de enfermedades y plagas (Qiao et al., 2014). Sin embargo, los cultivos por lo general son fumigados con pesticidas convencionales para reducir pérdidas del fruto causadas por patógenos no obstante el uso indiscriminado podría considerarse un enemigo tanto para el medio ambiente como el suelo y el agua de los mismos. Según Dalia Aiello et al., (2022) señala que *Bacillus* spp. producen una variedad de sustancias, como lipopéptidos sintetizados no ribosomales, péptidos, compuestos policétidos, bacteriocinas y sideróforos, teniendo un efecto inhibitor sobre patógenos fúngicos de plantas de cítricos entre otros cultivos.

Las especies de *Bacillus* spp., tienen una distribución global gracias a su capacidad para formar endosporas, una característica que les otorga resistencia y les permite colonizar una variedad de hábitats, incluyendo ecosistemas acuáticos y terrestres, así como ambientes que presentan condiciones extremas (Villarreal et al., 2018). Tejera et al., (2011) mencionaron que las especies están más asociadas a plantas, donde se ha demostrado sus potencialidades para la

producción de antibióticos, enzimas, solubilización de fosfatos y fijación biológica del nitrógeno (N).

Los bioplaguicidas podrían disminuir el riesgo para la salud humana y causar impactos significativos en el sector verde, los mismos que mediante herramientas biotecnológicas impulsan el desarrollo y la fisiología vegetal, considerándolos apropiados para su aplicación y biorremediación del suelo agrícola (Bautista et al., 2018).

El género *Bacillus* spp. destaca como el grupo microbiano más utilizado en la implementación del control biológico contra patógenos y plagas, capaz de inhibir el crecimiento de organismos celulares, tales como hongos, insectos, bacterias y nematodos (Gutierrez et al., 2015). (Dunlap, 2019) destaca que *Bacillus* spp., es una de las categorías más significativas de agentes de control biológico bacteriano.

El segundo conjunto más destacado de agentes de control biológico bacteriano está constituido por cepas pertenecientes al grupo *Bacillus subtilis*, comercializadas principalmente como tratamientos antifúngicos destinados a inhibir patógenos en plantas. Estas cepas suelen estar registradas bajo la clasificación de *B. subtilis* o *Bacillus amyloliquefaciens* (Dunlap, 2019). Según Ladurner, el bioformulado a base de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* en la cepa D747 es un fungicida-bactericida, capaz de controlar diversas enfermedades fúngicas y bacterianas en distintos cultivos como el kiwi, la vid, la fresa, las solanáceas, la lechuga, etc. (Ladurner et al., 2016).

Villarreal et al., (2018) mencionaron que, para realizar la clasificación taxonómica y diferenciación de especies pertenecientes al grupo *Bacillus* es importante estudiar el gen 16S ribosomal; Megan C. Morgan et al., (2009) indica que los métodos de secuenciación del gen del ARN ribosomal (ARNr) 16S obtuvo un porcentaje de precisión sustancialmente mayor en comparación con métodos convencionales, además, el método molecular es sensible y específico.

## CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.1. Planteamiento del problema

En la actualidad, los agentes de control biológico desempeñan un papel crucial en la protección de cultivos, convirtiéndose en una alternativa viable para el control preventivo de enfermedades y plagas (Viera et al., 2020). Las especies de *Bacillus* spp. se destacan como bacterias promotoras del crecimiento vegetal e inductoras de resistencia sistémica (Villarreal Delgado et al., 2018); beneficiando positivamente el desarrollo de las plantas, con las aplicaciones de bacterias Gram positivas formadoras de esporas capaces de habitar en la rizosfera de las plantas a través del sistema de modulación génico (Velasco et al., 2020).

Los diversos sistemas de manejo agronómico de una plantación convencional (químico) y una orgánica es notoria en la conservación del suelo. En un cultivo orgánico se evidencia el incremento de la diversidad microbiana principalmente en la interacción entre bacteria-bacteria y bacteria-hospedero, beneficiando al control biológico, donde las prácticas están arraigadas al cuidado del medio ambiente y conservación de los suelos manteniendo una producción sostenible (Anchundia et al., 2021).

Las ciencias Ómicas permiten conocer las características genómicas específicas (Frigolet et al., 2017), así como las propiedades beneficiosas de bacterias antagonistas que tratan de aprovechar su potencial en el fomento del crecimiento de las plantas buscando alternativas de biocontrol mediante la interacción de enzimas líticas (Hernández et al., 2014).

El objetivo de la presente investigación se centra en evaluar la eficacia de la acción bactericida del *Bacillus* spp. en el manejo de Sigatoka Negra presente en cultivos de *Musa paradisiaca* L., *in situ* y comprobar su presencia mediante el estudio Ómico utilizando herramientas bioinformáticas.

### 1.2. Delimitación del problema

El estudio de bacterias biorremediadores han demostrado ser una alternativa viable para el medio ambiente y para el control preventivo de enfermedades que perjudican a cultivos de intereses económicos, como el caso del banano siendo SN la enfermedad más relevante por su

agresividad, por ello se realizó el estudio de *Bacillus* spp. mediante técnicas moleculares, que son de utilidad biotecnológica para poder comprender el mecanismo de factores de modulación y se puedan aplicar de forma *in situ*. En la actualidad se ha estudiado poco sobre el comportamiento de las estructuras moleculares a nivel microbiano por tal motivo se plantea un estudio metagenómico para determinar la acción que ejerce *Bacillus* spp. hacia *Mycosphaerella fijiensis* en campo.

### **1.2.1. Espacio**

La presente investigación se la realizó en la república del Ecuador, Región Costa, Provincia de Los Ríos, cantón Quevedo.

### **1.2.2. Tiempo**

El estudio bibliográfico estará basado en investigaciones de los últimos 10 años. El trabajo experimental fue realizado durante 12 meses de acuerdo con los diferentes resultados físicos, químicos, microbiológicos, metagenómicos, bioinformáticos y estadísticos.

### **1.2.3. Universo**

La investigación se la realizó por el método de hoja simple en las parcelas experimentales de la “Estación experimental de Banano Ecuador” y mediante biomarcadores de estudio.

## **1.3. Formulación del problema**

- ¿Cuál es la acción bactericida del *Bacillus* spp. para el control preventivo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet?

## **1.4. Preguntas de investigación**

- ¿Cuál es la dosis recomendada de *Bacillus* spp. para el control de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet?
- ¿Comprobar la filogenia del *Bacillus* spp. mediante la secuenciación del gen del ARN ribosomal (ARNr) 16S?
- ¿Evaluar los días de control del *Bacillus* spp. en un cultivo *Musa paradisiaca* Morelet ?

## 1.5. Determinación del tema

Se requieren de alternativas viables para el control preventivo de la enfermedad *M. fijiensis*, existiendo una amplia diversidad de microorganismos potencialmente prometedores como agentes de control biológico, en esta investigación estudiaremos a *Bacillus* spp. como una herramienta para emplearla en un programa fitosanitario.

## 1.6. Objetivo General

Evaluar la eficacia de la acción bactericida del *Bacillus* spp. en el manejo de Sigatoka Negra en el cultivo de *Musa paradisiaca* L., *in situ*.

## 1.7. Objetivo Específicos

- Analizar cepas antagónicas de estudio mediante metagenómica para comprobar la filogenia de *Bacillus* spp. mediante la amplificación del gen 16S.
- Comprobar el efecto de diferentes dosis de *Bacillus* spp. en el control de Sigatoka Negra en el cultivo de banano.
- Diferenciar el grado de estrés biótico en plantas de banano mediante la técnica de ritmo de emisión foliar para comprobar el grado de desorden fisiológico.

## 1.8. Hipótesis

### 1.8.1. Hipótesis General

La dosis de un litro y medio por hectárea de *Bacillus* spp. tiene un control preventivo del 80% hacia *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, enfermedad crucial en el cultivo de *Musa paradisiaca* L.

### 1.8.2. Hipótesis Particular

Los programas fitosanitarios utilizan el agente biológico, *Bacillus* spp. *Plantarum* para contribuir la sostenibilidad de cultivos y reducir la incidencia de factores bióticos.

## 1.9. Declaración de las variables

## Hipótesis 1:

- **Hipótesis Independiente:** La dosis recomendada de *Bacillus* spp. para el control preventivo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet 1500 ml por hectárea.
- **Variables Dependiente:** La dosis de un litro por hectárea de *Bacillus* spp. disminuyo un 80% la severidad de la enfermedad de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

### 1.10. Justificación

La Sigatoka Negra, es una enfermedad prevalente en el cultivo del banano, se reconoce como una de las principales limitaciones para la producción a nivel global. Su gestión tradicional implica el uso de fungicidas, donde conlleva riesgos para el medio ambiente debido a la contaminación y contribuye al aumento significativo de los costos de producción (Barrera et al., 2016).

El control preventivo de SN, requiere de frecuentes tratamientos químicos con fungicidas, ocasionando que los costos de producción y la resistencia de los patógenos a los fungicidas se incrementen, por ello la importancia de buscar alternativas derivadas de plantas y hongos que tengan actividad fungicida como es el caso de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Saccharomyces cerevisiae*, siendo posible reducir el uso químicos hasta un 25% de fungicidas tradicionales (mancozeb y clorotalonil) (Becker et al., 2021).

El uso frecuente de agroquímicos ha resultado en la disminución de la sensibilidad de *M. fijiensis* a diversos grupos químicos. En este contexto, es una práctica habitual llevar a cabo evaluaciones para determinar la sensibilidad del hongo frente a diferentes moléculas (Campo et al., 2020). La búsqueda de nuevas alternativas viables para el control de la enfermedad cada vez es más importante, con el objetivo de incorporarlas en un programa integral de manejo de la enfermedad.

El método de hoja simple ejecutado en las parcelas experimentales, serán el principal indicador en la eficacia del *Bacillus* spp. para el manejo preventivo de Sigatoka Negra, siendo un escenario idóneo de la enfermedad.

Las formulaciones de biofertilizantes y biocontrol, elaboradas a partir de cepas de *Bacillus* que forman endosporas, están ganando popularidad gracias a su prolongada duración, comparable

a la de los agroquímicos, en la actualidad encontramos en el mercado representantes naturales, principalmente de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* (Qiao et al., 2014).

## **1.11. Alcance y limitaciones**

### **1.11.1. Alcance**

La presente investigación experimental tiene como objetivo explorar y proponer alternativas sostenibles para el control preventivo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, considerada la enfermedad con mayor impacto económico en la producción de banano en el país.

Con los cinco tratamientos en estudio se logró identificar la dosis con mayor eficacia de la acción bactericida del *Bacillus* spp. para reducir los niveles de infección de Sigatoka negra en el cultivo de banano y de esta forma proporcionar a una alternativa viable para incluirla en un programa fitosanitario.

Dada las restricciones y límites máximos de residuos para fungicidas en el cultivo de banano en Europa y Estados Unidos en actualidad, estas están sujetas a regulaciones específicas de cada país por ello la importancia de tener alternativas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.

El estudio metagenómico es una herramienta valiosa para comprender la información genética de bacterias, hongos y demás organismos de interés y poderlos aplicar de manera efectiva en la rama de la agricultura, por ello la importancia de realizar un estudio de esta calidad en la investigación ya que se pudo observar la taxonomía y morfología de la cepa en estudio.

### 1.11.2. Limitaciones

Los resultados pueden verse influenciados por condiciones específicas en ambos escenarios ya sea en campo o laboratorio, como son las condiciones climáticas, edáficas, humedad, asepsia pudiendo afectar la efectividad del microorganismo en estudio y alterar la información.

El periodo de estudio es otra limitante, un estudio a corto tiempo puede dar como resultado información con pocas repeticiones o muestras y en estadística se requieren varias repeticiones para obtener resultados más confiables y generalizados reduciendo el error aleatorio y obteniendo una estimación más precisa de los parámetros de interés.

Tener enfoque adicional de la eficacia del *Bacillus* spp. para el control de SN, por el corto tiempo no se pudo realizar una siembra in vitro aislando la cepa. La realización de estas pruebas a nivel de laboratorio habría proporcionado datos adicionales que fortalecerían la validez de la investigación.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 2.1. Antecedentes

### 2.2. *Musa paradisiaca* L.

El origen, diversidad, variaciones genómicas y niveles de ploidía es fundamental para avanzar en el mejoramiento de *Musa sp.*, se tiene como centro de origen de que el sudeste asiático sirve como su centro de origen, y este lugar propuesto alberga la mayor diversidad de especies silvestres de la misma (Barekye, 2009).

El cultivo de banano demanda condiciones edafoclimáticas, tales como suelos con texturas de tipo franco arenoso, franco arcilloso o franco limoso con menos del 40% de contenido de arcilla, adicional requiere un perfil de suelo con una profundidad superior a 1.20 m, donde la capa freática este por debajo del perfil típico, con respecto al pH óptimo para el cultivo es de 6,5, aunque tolera rangos entre 5,5 y 7,5 y temperaturas que oscilen entre 25-30 °C (Tuz, 2018).

Hoy en día la demanda nutricional del cultivo de banano es alta y para lograr niveles adecuados de rendimiento se requiere emplear un programa agronómico que incrementen su vigor (Villaseñor, et al., 2020). Por lo tanto, contribuye a mantener los equilibrios fisiológicos necesario para el crecimiento y producción de las plantas en condiciones óptimas (Fratoni et al., 2017).

La producción más significativa de banano en Ecuador se localiza en la cuenca hidrográfica de las zonas 1-4-5-6-7, la cual suministra agua a las zonas más densamente pobladas del país (Unda, 2020). Debido a las condiciones geográficas y climáticas necesarias para su cultivo, la mayoría de las plantaciones de banano se encuentran en la región costera.

La provincia de los Ríos en el año 2019 lidero en términos de área planta con 36.00%, seguida por Guayas con 30.00%, El Oro con 25.00%, Cotopaxi con 3.00%, otras provincias contribuyeron con 6.00% (CFN, 2020).

La producción de banano tiene un impacto directo en el deterioro de la biodiversidad, donde la expansión constante de las áreas de cultivo agrava la inestabilidad de las fronteras agrícolas, además la urgencia de adoptar prácticas agrícolas sostenibles y libres de pesticidas para salvaguardar las bases de la seguridad alimentaria en las regiones donde se lleva a cabo la producción de banano (Zhiminaicela et al., 2020).

## 2.3. Enfermedades que afectan al cultivo de banano

El banano es considerado el cuarto cultivo con mayor relevancia en el mundo, superándolo los cultivos de arroz, trigo y maíz, cultivándose en más de 120 países, constituye el principal alimento por sus altos contenidos nutricionales, calidad y durabilidad del transporte a distancias extensas (García et al., 2022).

La distribución de germoplasmas, hijuelos y cormos de las musas ha provocado la diseminación de plagas y enfermedades a nuevas zonas cultivables, dentro de las principales enfermedades de importancia cuarentenaria y económica se encuentran: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4, *Pseudocercospora* (*Mycosphaerella*) *fijiensis*, *Ralstonia solanacearum*, llegando a ocasionar problemas económicos significativos sino se lleva un adecuado control fitosanitario y un manejo integrado (Manzo et al., 2014).

### 2.3.1. Sigatoka Negra

La enfermedad SN según Sánchez et al., (2021) indicó que se describió por primera vez en 1963 en las Islas Fiji. Es causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, se caracteriza por su capacidad de reproducción tanto sexual (ascosporas) como asexual (conidios) de su anamorfo *Paracercospora fijiensis*, provocando una amplia dispersión de esporas en las plantaciones bananeras, ocasionando una necrosis parcial o total en la superficie foliar de la planta, esta afectación puede reducir hasta un 50% la producción (Barrera et al., 2016).

La morfología de *Pseudocercospora fijiensis*, se caracterizan por ser conidios hialinos obclavados a cilíndricos, rectos o curvos de 6 a 9 septos, pueden surgir directamente a través de las estomas ya sea de forma individual o en grupo como resultado de la reproducción asexual. Estas estructuras septadas varían en número de compartimientos de 0 a 5 con longitudes que oscilan entre 16.5 y 62.5 mm y anchos de 4 a 7mm (Valdivia, 2022).

La fase sexual de *Mycosphaerella fijiensis* ocurre en las lesiones maduras donde se produce la liberación de ascosporas. Estas ascosporas son la principal fuente de infección a largas distancias, siendo liberadas durante periodos de alta humedad y dispersadas por el viento. La

reproducción sexual ocurre en estructuras específicas llamadas peritecios o pseudotecios dentro de las cuales se encuentran las ascas que contienen las ascosporas (García et al., 2022).

El desarrollo de la enfermedad está directamente influenciado por las condiciones climáticas, la variedad del cultivar sembrado y las labores de manejo del cultivo. Las áreas con mayor incidencia de la enfermedad se caracterizan por una precipitación anual superior a 1400 mm, una humedad relativa superior al 80% y temperaturas que oscilan entre 23 y 28 °C (Álvarez et al., 2013). Para reducir la incidencia de la enfermedad se recomienda un manejo preventivo mediante la aplicación de estrategias que involucren deshoje, despunte de hojas y aplicación de fungicidas (Barrera et al., 2016) .

Es la enfermedad foliar más relevante desde el punto de vista económico en la producción mundial de banano y plátano (Cedeño et al., 2021). Sigatoka Negra inicia afectando el envés de las hojas, dando lugar a lesiones necróticas o manchas con halos amarillos y un centro gris claro en áreas extensas del tejido foliar. Este impacto se centra en las hojas más jóvenes causando daños significativos en los tejidos fotosintéticos (Ramírez et al., 2014).

*Mycosphaerella fijiensis* Morelet se la identifico por primera vez en Ecuador en febrero de 1987, en la provincia de Esmeraldas, en el año 1989, se registraron casos en las provincias de Los Ríos y Guayas, en 1992, la enfermedad se diseminó en las plantaciones bananeras de la provincia de El Oro, al sur de país (Tuz, 2018).

De acuerdo con información previa, la resistencia de Sigatoka Negra se vincula con un alelo recesivo denominado *bs1* y dos alelos independientes que presentan efectos aditivos, conocidos como *bsr2* y *bsr3*. (Craenen K, 1997; Dos Santos Nascimento et al., 2020) indicaron que se ha reportado una interacción intralocus en *bs1*, la cual parece estar asociada con la manifestación de signos foliares tempranos y con la interacción intraloci en los loci *bsr*, que afecta la progresión de la enfermedad.

### 2.3.2. Mal de Panamá raza tropical 4

El mal de Panamá causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* considerada la enfermedad más destructiva de las musáceas (Ploetz, 2015). En los años 1900 y 1960 la raza 1 impacto en la producción comercial de banano del cultivar Gros Michel (AAA), una nueva variante de este patógeno conocido como su nombre como Fusarium Raza 4 tropical (Foc R4T) ha causado devastar áreas enteras del cultivo en los continentes asiáticos y africanos (Guzmán et al., 2022). La raza 4 afecta en todas las variedades que son susceptibles a la raza 1-2, especialmente en los cultivares pertenecientes al subgrupo Cavendish (Magdama, 2019).

Se subdivide la raza 4 en Subtropical (STR4) causando daños en zonas subtropicales bajo condiciones de estrés como sequías y temperaturas bajas y Tropical (R4T) provoca enfermedades en regiones tropicales sin requerir la presencia de ningún factor de estrés adicional y en ambas tienen una composición genética distinta (Magdama, 2019). En la última década se ha confirmado la presencia de este patógeno en países como Australia (2015), Israel (2016) y Colombia (2019) y se han venido desarrollando medidas oportunas y óptimas con el fin de contener y erradicar que el hongo se siga propagando (Aguilar et al., 2021).

Es un hongo que a diferencia de otros patógenos a pesar de que eliminemos su hospedero puede sobrevivir de materia orgánica o tejido que este en descomposición en el suelo, debido a su capacidad saprofita ya que pueden producir estructuras de resistencia denominadas clamidosporas que permiten al hongo sobrevivir en el suelo por un periodo largo y convirtiéndolo en un patógeno difícil de combatirlo (Magdama, 2019).

La sintomatología más prominente de esta enfermedad es en el tejido foliar con un amarillamiento y marchitez de las hojas de color marrón rojizo de sus conductos vasculares del pseudotallo provocando una obstrucción de los haces vasculares en la planta debido a la infección y avance del hongo, limitando la translocación del suministro de agua y su proceso de fotosíntesis se ve afectado (Aguilar et al., 2021; Magdama, 2019).

### 2.3.3. *Ralstonia solanacearum*

El Moko del banano causado por *Ralstonia solanacearum*, considerada como una enfermedad destructiva de las musas, ocasionando pérdidas económicas significativas en el cultivo (Ramírez et al., 2020). Por su diversidad genética afecta a más de 200 especies vegetales (García et al., 2019) esta bacteria patógena tiene un amplio rango de huéspedes como son el tomate, papa y anturio, mientras que en el caso de las musas y heliconias la marchitez bacteriana es conocida como enfermedad del moko (Ailloud et al., 2015).

La sintomatología es similar al mal de Panamá, ya que causan marchitamiento vascular y decoloración de los vasos vasculares (N'Guessan et al., 2013) limitando el paso del agua (García et al., 2019). Los síntomas específicos pueden modificarse entre los huéspedes susceptibles, la característica general entre todos es el marchitamiento y amarillamiento de las hojas más jóvenes de forma unilateral (García et al., 2019).

Tiene una diversidad subyacente ya que *R. solanacearum* coloniza malezas que están asociadas con las plantaciones de las *Musa* spp. y no se observan sintomatología, y al ser una bacteria saprofita puede sobrevivir en el suelo y/o agua durante largos períodos (Gutarra et al., 2017).

Esta enfermedad tiene opciones limitadas para su control debido a su fácil dispersión y los efectos devastadores que provoca (Ramírez et al., 2020), este patógeno afecta a todos los cultivares del género *Musa* (Cruz et al., 2023) provoca un crecimiento retrasado, marchitamiento y los rendimientos de los cultivos se ven afectados generando pérdidas económicas.

### 2.4. Control químico de las enfermedades que afectan a los cultivos de *Musa* spp.

Debido que *M. fijiensis* está presente en la mayoría de las zonas bananeras a nivel mundial, se emplean fungicidas sintéticos protectantes y sistémicos para su control. Los fungicidas protectantes como Clorotalonil y Mancozeb, desempeñan la función principal de prevenir la enfermedad al impedir la germinación de las esporas de los hongos en el tejido foliar, mientras que

los sistémicos son traslaminares y poseen la capacidad de ingresar a los tejidos internos de la planta, controlando los primeros estadios del hongo (Mena y Couoh, 2015).

Los fungicidas sistémicos corresponden a los ingredientes activo que ingresan las barreras estructurales de la hoja incorporándose al apoplasto y estos son traslocados en las áreas de mayor transpiración (INTAGRI, 2018). Los procesos de absorción y traslocación de los fungicidas dependerán de los ingredientes activos y sus propiedades físico-químicas, peso molecular, lipofilia y solubilidad en agua.

El FRAC es el Comité de Acción contra la Resistencia a Fungicidas, se encarga de establecer directrices para el uso responsable de los fungicidas, principalmente con los sistémicos que son unisitio dentro del metabolismo celular del hongo a diferencia de los protectantes, son multisitio haciéndolos versátiles en el control (Quevedo et al., 2018).

Dentro del grupo de fungicidas para el control de SN encontramos varias clases químicas: Inhibidores de la desmetilación (DMIs), Aminas, Inhibidores Qo (Qols), Inhibidores (Qils), Anilino pirimidinas (APs), Benzimidazoles (BCMs), Toluamidas, N-Fenil carbamatos, Inhibidores SDH (SDHIs), Guanidinas, Multisitio, Biológicos (FRAC, 2018).

## **2.5. Efectos de las aplicaciones químicas en el cultivo**

El manejo de la agricultura moderna en la actualidad involucra aplicaciones de químicos para el control preventivo de enfermedades y plagas, la utilización de estos constituye en ciertas ocasiones una medida práctica, rápida, eficiente y económicamente viable (Carmona y Sautua, 2017). Sin embargo, pueden generar resistencia el inoculo a tratar, provocando problemas a todo agente involucrado en el área de producción (Hollomon, 2015) .

El termino de resistencia a fungicidas se refiere a la disminución adquirida y heredable de la sensibilidad de un hongo a un agente antifúngico específico (Beckerman, 2013). Una de las formas para determinar la eficacia en campo es a través de bioensayos donde las técnicas moleculares son cada vez más populares para detectar la resistencia y esta no ocurre de forma

inevitable sino está condicionada por las propiedades tanto del patógeno como de los fungicidas (Hollomon, 2015).

Las cepas resistentes se generan a partir de las mutaciones genéticas que se caracterizan por tener baja tasa de ocurrencia, significa que la probabilidad de aparición es tan reducida que inicialmente la población no refleja alteración, luego las cepas sensibles o susceptibles a un fungicida son reemplazadas por cepas que han desarrollado resistencia a ese agente (fungicida) debido a la multiplicación acelerada de estas en presencia del fungicida. Finalmente, estas cepas resistentes comienzan a prevalecer en la población, volviendo completamente ineficiente al fungicida correspondiente (Carmona y Sautua, 2017).

Cuando hay un excesivo uso de fungicidas en los cultivos para controlar la enfermedad, provoca la acumulación de residuos en el medio ambiente, destrucción de la flora y fauna beneficiosa, así como intoxicaciones y enfermedades en los seres vivos, además se genera la pérdida de sensibilidad de SN a ciertas moléculas químicas debido a la considerada plasticidad genética, dada por sus tipos de reproducción vegetativa tanto sexual como asexual (Sánchez et al., 2012; Ayala et al., 2014).

Esta situación genera la necesidad de buscar alternativas que permitan reducir los daños que ocasionan los químicos y dirigirse a las tendencias del mercado actual, el uso de biofungicidas como estrategias prometedoras para el control preventivo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Ayala et al., 2014).

## **2.6. Efectos de los químicos en los humanos**

Las aplicaciones constantes de fungicidas a los cultivos pueden causar riesgo de acumulación de estos residuos en suelos, acuíferos y organismos vivos, las cuales pueden ser consumidos posterior a la fumigación por los seres vivos (Bharadwaj et al., 2014).

La descomposición de los fungicidas en el medio ambiente, es variable, en el caso de Mancozeb permanece en el suelo durante aproximadamente 17 días, pero en el proceso de

descomposicion en el ecosistema es via fotolisis, hidrolisis o por degradacion biologica, generando un producto denominado etilenotiourea, sustancia altamente nociva para la salud humana, especificamente el sistema digestivo, la glandula tiroidea y presenta propiedades cancerigenas (Mena y Couoh, 2015).

Los agroquimicos utilizados en los cultivos de banano representan uno de los principales riesgos laborales para los trabajadores y tambien para sus familias y comunidades aledañas a las plantaciones (González Ordóñez, 2018). Las fumigaciones aereas, las aplicaciones de nematicidas, insecticidas y herbicidas corresponden una fuente de contaminacion directa a los seres bioticos y abioticos involucrados en la produccion y fuentes aledañas a estos (Apolinario Quintana et al., 2015).

La exposición a plaguicidas durante largos periodos de tiempo puede causar problemas a largo plazo como cáncer, daños en el sistema respiratorio, alergias, problemas en el sistema reproductor, malformaciones, neurodegenerativas entre otras enfermedades (Mena y Couoh, 2015; González, 2018).

## **2.7. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal**

El principal sector de crecimiento económico de los países en vías de desarrollo es la agricultura, y la demanda de fertilizantes sintéticos que implica en los sistemas de producción es alta, es por ello por lo que un método para reducir el uso y no generar impactos negativos en el medio ambiente es la aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) como inoculantes microbianos (Reséndez et al.,2018).

El termino de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal fue dado por J. W. Kloepper y M. N. Schroth en el año 1978, describen a las bacterias que se encuentran en la rizosfera y benefician en el desarrollo de los cultivos, debido que tienen la capacidad de colonizar activamente el sistema radicular para optimizar y/o potenciar el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Reséndez et al., 2018).

Las bacterias rizosféricas representan alrededor del 2-5%, las RPCV reportadas como géneros de bacterias son: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcous*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* utilizándolas como bioinoculantes ya sea como herbicidas, insecticidas, fungicidas, entre otros usos para favorecer el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Ahemad y Kibret, 2014).

Una alternativa sustentable que favorece la disponibilidad de los elementos nutricionales para el crecimiento de los cultivos y sus rendimientos es empleando los RPCV como biofertilizantes ya que la interacción entre las rizobacterias y las especies vegetales es a través de su sistema radicular (Nehra et al., 2016). Estudios metagenómicos realizados en los últimos años a rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), buscan explicar el mecanismo molecular de las interacciones implicadas en la planta-microbio para comprender la función. (Duchen y Torres, 2021).

Los efectos benéficos que generan las RPCV en las plantas es a través de dos mecanismos ya sea directo o indirecto o una combinación de ambas (Parray et al., 2016). Los mecanismos se desencadenan cuando las bacterias sintetizan metabolitos que benefician a las plantas o cuando estas aumentan la disponibilidad de los nutrientes esenciales para su metabolismo, mejorando su proceso nutricional, donde se destacan: la fijación de nitrógeno, la síntesis de fitohormonas, enzimas y vitaminas, la solubilización de fosforo inorgánico y la mineralización de fosfato orgánico, la acumulación de nitratos, la secreción de sideróforos, la reducción de los niveles de etileno en los suelos, el incremento de la permeabilidad de las raíces, entre otros mecanismos (Esquivel et al., 2013).

Los mecanismos indirectos se caracterizan por disminuir o eliminar los microorganismos patógenos que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal producen, a través de la producción de sustancias antimicrobianas o de antibióticos, enzimas líticas o una combinación de ambas; también se incluye la inducción de resistencia sistémica a diversos organismos patógenos y la producción de sideróforos como estrategia para capturar el hierro disponible en el suelo y así

restingir el desarrollo y la presencia de estos fitopatogenos, entre otras características (Esquivel et al., 2013).

### **2.7.1. Bioestimulante**

Se denominan bioestimulante a los productos que son usados para mejorar los sistemas de producción agrícolas y son elaborados a partir de sustancias naturales. Tiene una amplia variedad de usos que incluyen estímulo del crecimiento de los cultivos mediante biofertilizantes, así como la protección contra sus enemigos naturales actuando como bioinsecticidas, biofungicidas, biobactericida, bioplaguicidas (Gallez et al., 2017).

La sostenibilidad y la productividad son dos de los factores claves que los agricultores están desafiando para incrementar la producción, preservar el medio ambiente y el bienestar de los organismos vivos, debido a la crisis mundial que atraviesa la agricultura; el cambio climático genero el surgimiento de la industria de insumos biológicos, siendo productos amigables con el medio ambiente y la salud humana, de esta forma contribuyen a controlar las plagas con menos riesgos en comparación con el uso de agroquímicos (Viera et al., 2020).

En la última década, se ha evidenciado que la utilización de herramientas biotecnológicas mediante la aplicación de bacterias que colonizan las raíces de las plantas. El uso de bioestimulante promueven su crecimiento siendo una alternativa eficaz y respetuosa con el medio ambiente frente a los pesticidas y fertilizantes químicos (Qiao et al., 2014). El uso de los productos biológicos está en su auge debido a las necesidades del agricultor y el consumidor final.

La investigación sobre la capacidad de *Bacillus* comenzó con el descubrimiento de la actividad insecticida de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis*; actualmente, diversas especies del género *Bacillus* spp. como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*, son objeto de estudio, con el objetivo de reducir la incidencia de enfermedades relevantes en la agricultura (Villarreal et al., 2018).

### **2.7.2. Agentes de control biológico**

Los microorganismos empleados en el Control Biológico deben exhibir características claves, tales como un crecimiento rápido, una elevada capacidad de reproducción y supervivencia,

diversos niveles de dormancia, ausencia de antagonistas naturales, una marcada habilidad competitiva, adaptabilidad a la planta tratada y una gran versatilidad en el entorno (Viera et al., 2020).

Dentro de los agentes biológicos, encontramos una diversidad de especies del género *Bacillus*, estudios realizados han demostrado tener una actividad antagonista frente a distintos microorganismos fitopatógenos presentes en los cultivos agrícolas como maíz, frutales, arroz, entre otros (Yunlong et al., 2015).

Existe una amplia variedad de microorganismos potencialmente prometedores como agentes de control biológico, entre los que han sido más investigados y han dado lugar al desarrollo de numerosos productos, encontramos *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis*, *Paecilomyces lilacinus* y *Verticillium lecanii* (Viera et al., 2020).

El caso de la *Pseudomonas fluorescens*, cepa WCS417r, es una inductora de la respuesta ISR que permite proteger a los cultivos frente a una infección causada por *P.syringae* pv. *tomato* entre otras cepas como son los *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. o *Trichoderma* spp. pueden ser aplicados como estrategias preventivas para inducir resistencia a patógenos bacterianos en las plantas (Bonaterra y Montesinos, 2020).

## **2.8. Antecedentes del *Bacillus* spp.**

Según Villarreal et al., (2018) señalaron que el género *Bacillus* fue inicialmente identificado por Cohn en 1872, quien lo caracterizó como bacterias capaces de generar endosporas con resistencia al calor. Las especies pertenecientes al género *Bacillus* se encuentran clasificadas en el Reino Bacteria, el Filo Firmicutes, la Clase Bacilli, el Orden Bacillales y la Familia Bacillaceae.

En la actualidad, el género *Bacillus* abarca más de 336 especies que, debido a su similitud genética, pueden clasificarse en diversos grupos. Entre los más destacados se encuentran: a) grupo asociado a patogenicidad, representado por *B. cereus*, que incluye a *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*; b) bacilos ambientales, caracterizados por su presencia en diversos hábitats. Destaca el grupo de *Bacillus subtilis*, conformado por *B. subtilis-licheniformis-pumilus*; c) grupo que comprende a *B. clausii-halodurans*; d) GRUPO que engloba a *Bacillus* spp. NRRLB-1411-coahuilensis (Alcaraz et al., 2010).

(Alvarez y Sánchez, 2016) indican que las especies mas representativas se encuentran *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* considerados como controladores biológicos por su presencia en el suelo, a la producción de esporas que resisten el calor, desecación, irradiación UV y a los solventes orgánicos.

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* exhiben una amplia distribución en una variedad de hábitats, abarcando desde ecosistemas acuáticos de agua dulce y marinos hasta suelos diversos (Vanegas y Rodríguez, 2018; Tejera et al., 2011). Con frecuencia, sus distintas especies establecen asociaciones significativas con plantas. Entre las características distintivas del género *Bacillus* spp, se destaca su capacidad de crecimiento tanto aerobio como, en ocasiones, anaerobio facultativo. Son bacterias Gram positivas, con morfología bacilar, movilidad flagelar y tamaño variable que oscila entre 0.5 y 10  $\mu\text{m}$ . Su crecimiento alcanza pH neutro, y presentan un amplio rango de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas, con una temperatura óptima entre 30 y 45 °C. La diversidad metabólica del género *Bacillus* está asociada a la promoción del crecimiento vegetal y al control de patógenos (Tejera et al., 2011).

*Bacillus* spp, tienen la capacidad para producir compuestos orgánicos, realizar la fijación biológica de Nitrógeno, solubilizar fosfatos, las efectúan mediante enzimas nitrogenadas y fitasas, con impacto beneficioso en el estímulo del crecimiento vegetal y el aumento del potencial productivo (Ramírez et al., 2017). Puede ocurrir de forma directa o indirecta la interacción del género *Bacillus* spp., con el hábitat terrestre; en el primer caso al desempeñarse como agente rizosférico, tiene la capacidad de degradar sustratos derivados de hidrocarburos, además favorece la producción de antibióticos, promueve el crecimiento vegetal y participa en procesos como la fijación de N y la solubilización de fosfatos; en cuanto a la interacción indirecta, contribuye a la producción de sustancias antagonistas de patógenos e induce a mecanismos de resistencia (Angulo et al., 2012).

En un analisis comparativo de la secuencias de genes ARNr de una colección de 51 especies de *Bacillus*, se logro su agrupación en cinco conjuntos diferentes, en estudios seguidos por investigaciones adicionales han llevado a la creacion de varios generos nuevos que se originan desde *Bacillus*, entre estos encontramos: *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Virgibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Gracilibacillus*, *Salibacillus* y en un futuro próximo se espera la reclasificación de más generos y especies nuevas (Amaresan et al., 2020).

## 2.9. *Bacillus amyloliquefaciens*

Las bacterias del grupo *Bacillus amyloliquefaciens*, se caracterizan por ser Gram positivas, formadoras de endosporas y tener una morfología en forma de bastón (González et al., 2022). Desde el punto de vista taxonómico, pertenece al complejo de especies *Bacillus subtilis*, encuadrándose dentro de la familia *Bacillaceae*, la clase *Bacilli* y el filo *Firmicutes* (Ngalimat et al., 2021).

Se destaca por su amplia distribución, debido que coloniza prácticamente todos los entornos y viven en una amplia gama de temperaturas, caracterizándolo con su notable capacidad genética y adaptación ambiental (Vanegas y Rodríguez, 2018).

Las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* poseen la capacidad de potenciar el desarrollo de las plantas a la vez que proporcionan protección mediante la generación de fitohormonas y compuestos antimicrobianos. La cepa FZB42, tiene la capacidad de llevar a cabo la síntesis no ribosómica de metabolitos secundarios, tales como lipopéptidos y policétidos, a través de genes con actividad antimicrobiana y antifúngica (Niazi A. et al., 2014).

Las cepas pertenecientes al grupo *amyloliquefaciens* exhiben la capacidad de metabolizar diversas fuentes de carbono tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y tienen la capacidad de generar una variedad de metabolitos, entre los que se incluyen lactato, etanol, acetato, CO<sub>2</sub>, xilitol, diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol (Chun et al., 2019).

BA es uno de los grupos de microorganismos con mayor relevancia en el mercado agrícola, pueden ser aplicados como biofertilizantes y biopesticidas; además se ajusta de manera óptima a la rizosfera y genera sustancias extracelulares beneficiosas que estimulan el crecimiento vegetal; proporcionando protección mediante agentes antifúngicos, fortaleciendo la inmunidad sistémica de las plantas (Vanegas y Rodríguez, 2018). (Yunlong et al., 2015) mencionaron que BA se separo de BS como una especie nueva y ambos fueron reportados como agentes de biocontrol. Posee varias ventajas BA y lo convierte como un buen candidato, ademas produce esporas que pueden resistir a condiciones adversas, favoreciendo en la distribucion comerial.

## 2.10. *Virgibacillus*

El género *Virgibacillus* posee notables similitudes con el género *Bacillus*, en el año 1998, experimentó una reclasificación del género *Bacillus* basandose en el análisis de la especie

*Virgibacillus pantothenicus* (Abdel et al., 2020), y en el año 2003 se generó una modificación en la descripción donde se reconoce 26 especies (Yin et al., 2015).

En un análisis de patrones ARDRA en identificación taxonomica y filogenia bacteriana del género *Bacillus*, se incluyen a *Paenibacillus* y *Virgibacillus* como especies relacionadas, donde el dendograma permite distinguir niveles de similitud del 50-60% en grupos grandes y estos corresponden con géneros que se separaron recientemente del principal (Amaresan et al., 2020).

Se reconoce la actividad antagonista de *Bacillus* spp. ya que producen diversas sustancias antimicrobianas, pero de *Virgibacillus* spp. en estudios realizados se ha informado como antagonista de *Staphylococcus aureus* (Galaviz et al., 2018). Los tipos de hábitat de este género se encuentra en permafrost, aguas residuales de riego, lagos salados (Yin et al., 2015).

Las bacterias pertenecientes al género *Virgibacillus* tienen la capacidad de mediar en el proceso de mineralización demostrando en estudios las capacidades variables para mineralización de carbonato con distintos niveles de contenido de magnesio, consideradas como posibles precursoras en la formación de dolomita (Galaviz et al., 2018).

### **2.11. *Paenibacillus***

Las especies *Paenibacillus* inicialmente estaban dentro del grupo del género *Bacillus*, históricamente se definió según características morfológicas compartidas con la especie *Bacillus subtilis*, aisladas en 1872; cualquier bacteria en forma de bastón se clasificaba como *Bacillus* ya sea aeróbica o anaeróbica facultativa, y podría generar endosporas que le posibiliten permanecer inactivo en entornos adversos (Grady et al., 2016).

El hábitat de *Paenibacillus* spp. se encuentran en mayor porcentaje en los suelos agrícolas, promoviendo la salud de los cultivos ya que algunas cepas suprimen patógenos y plagas presentes en los cultivos mediante la producción de metabolitos antibióticos, o actúan estimulando directamente el sistema inmunológico de planta hospedero antes de la infección (McSpadden et al., 2004).

En 1988 en un estudio realizado sobre taxonomía numérica de 188 caracteres unitarios propuso un marco para subdividir *Bacillus* en diversos géneros. En el año 1991 se logró una representación precisa de las relaciones filogenéticas entre este grupo de bacterias, al determinar

las secuencias del gen 16S ARNr para 51 especies previamente clasificadas como *Bacillus* (Grady et al., 2016).

Se deriva del adverbio latino *paene*, significa casi, se refiere a casi un bacilo; dentro de este grupo las bacterias pueden ser Gram positivas, Gram negativas o Gram variables ya que comparten características basales atribuidas de *Bacillus* (Zeigler, 2013).

## **2.12. Tinción de GRAM**

En la década de 1880 el médico danés Hans Christian Gram desarrollo la tinción bacteriológica más importante, en la cual se examinaron bacterias en tejidos pulmonares de pacientes con neumonía, observando que algunas se teñían en tonos violeta-azul mientras otras en tono rojo, denominando hoy en día como “Tinción de Gram”, estas bacterias se dividen en dos grupos: Gram positivas (tinción azul-violeta), Gram negativas (tiñen safranina-rojo) (Rodríguez y Arenas, 2018).

## **2.13. Sanger**

Reguero Reza, (2014) mencionan que Frederick Sanger en la década de 1940 interesado en conocer el metabolismo de los aminoácidos y la secuencia de estos en una proteína (insulina), en esa época no se disponía de conocimientos consolidados de la estructura del ADN, gracias a la investigación del científico pudo concluir que las dos cadenas polipeptídicas de la insulina poseían secuencias específicas de aminoácidos y por consiguiente cada proteína exhibía una secuencia única.

La primera herramienta para la obtención de fragmentos de ADN de distintos pesos moleculares, es la secuenciación de Sanger, esto se debe a presencia de nucleótidos de paro (González, 2021). Este método consiste en la amplificación de una región específica de ADN cuyos componentes son similares a los necesarios para la duplicación en un organismo o para la reacción en la cadena de polimerasa (PCR). Durante este proceso se generan copias del ADN *in vitro* utilizando la enzima polimerasa ADN, un cebador y los cuatro nucleótidos del ADN.

La secuenciación de Sanger resulta necesaria para índices, resulta esencial para definir la correcta ubicación genómica y puede ser usada con el fin de garantizar el control de calidad en análisis genéticos, a pesar de que el método está siendo reemplazado por la secuenciación de

próxima generación (NGS) debido a su costo, ha asumido otro posicionamiento en los procesos de laboratorio para analizar regiones generalmente de exones donde NGS no procesan datos con suficiente calidad (Baudhuin et al., 2015).

#### **2.14. Estudios metagenómicos**

Handelsman (2005, como se cito en Fadiji y Babalola, 2020) meciona que el termino metagenomica se introdujo por primera vez en 1998, y se refiere a la evaluacion de todo material genetico que es aisaldo directamente de muestras ambientales; las investigaciones metagenómicas pueden optar por un enfoque de secuenciación dirigida o de escopeta y esta elección está fuertemente influenciada por el tipo de estudios ambientales que se llevarán a cabo. Puede darnos una mejor comprensión sobre la importancia microbiana para los cultivos y las asociaciones que pueden existir entre estos (Stieglmeier et al., 2014).

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva de ADN permite crear información filogenética de las bacterias del suelo que se asocian con plantas de importancia agrícola (Buitrago et al., 2021). Las nuevas tecnologías en metagenómica que se da a través de la secuenciación de generaciones nuevas proporcionan una guía para cuantificar taxones del microbiota del suelo; la secuenciación metagenómica de escopeta optimiza la detección de sesgos de amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa y brinda un registro funcional detallado mediante un análisis genético avanzado (Duchen y Torres, 2021).

(Fadiji y Babalola, 2020) indicaron que el método convencional de secuenciación de ADN de Sanger se puede utilizar para la secuenciación de ADN individual, por ende, el resultado de la información será de poca relevancia cuando se deba analizar muestras ambientales complejas.

Estudios genómicos en el 2007 determinaron que la cepa BA FZB42 fue el primer representante de bacterias Gram positivas promotoras del crecimiento vegetal, su genoma contiene 3.695 secuencias codificantes de proteínas aproximadamente y revela un gran potencial para producir metabolitos secundarios, se destacan los policétidos bacillaeno, macrolactina y difficidina, dando como conclusión que los genes de subsp. *Plantarum* tienen una participación en las interacciones de planta-bacteria (Qiao et al., 2014).

En un estudio se evaluó el efecto de la cepa B068150 de BS en las comunidades microbianas presentes en la rizosfera de las plantas de pepino, utilizando la técnica de DGGE

(Electroforeses en gel con gradiente desnaturalizante); realizaron en tres tipos de suelos distintos y no encontraron cambios significativos en la diversidad microbiana del objeto de estudio (Yunlong et al., 2015).

(You et al., 2016) realizaron una inoculación de BS Tpb55, donde observaron cambios significativos en comunidad microbiana en la rizosfera del cultivo de tabaco, y además se redujo la infección de *Phytophthora parasitica*, mediante un análisis ANDRA (Análisis de Restricción del ADN Ribosomal 16S Amplificado), resaltando la abundancia relativa de ciertas comunidades, especialmente aquellas pertenecientes a filos dominantes.

### **2.15. Mecanismos de los *Bacillus* spp.**

La extensa diversidad metabólica de *Bacillus* spp. lo convierte en uno de los géneros más destacados, principalmente a su capacidad para reprimir tanto directa como indirectamente el crecimiento de agentes patógenos presentes en las plantas (Ruiz et al., 2020). Por lo tanto, es esencial profundizar los mecanismos de control biológico contra los fitopatógenos donde destacan las tres familias de lipopéptidos: surfactinas, iturinas y fengicinas, son compuestos con características anfífilas con bajo peso molecular que suministran protección a los cultivos durante sus etapas fenológicas (Sánchez, 2016).

Coute et al., (2017) informaron que recientemente se han encontrado de once géneros microbianos, 263 lipopéptidos distintos sintetizados, del cual *Bacillus* spp. corresponde con 98 diferentes lipopéptidos que están clasificados en familias: surfactinas, iturinas y fengicinas, siendo de gran interés por su actividad antagonista para diversos fitopatógenos potenciales donde se incluye a bacterias, hongos y oomicetos. Las surfactinas destaca como la familia más estudiada de lipopéptidos (Saraf et al., 2014) tiene la capacidad de inducir resistencia sistémica en las plantas y promover la proliferación de células bacterianas, facilitando la colonización de la rizosfera efectiva de la rizosfera (Sánchez, 2016).

(Saraf et al., 2014) indica que las surfactinas sintetizadas por BA FZB42 además de proteger contra bacterias tiene la habilidad de formar biopelículas otorgando a la bacteria una ventaja antagonista durante el proceso de colonización de la superficie. En otro estudio realizado por (Bais et al., 2004 citado Sánchez, 2016) informaron la acción que tienen las surfactinas como

protección en condiciones *in situ*, demostrando que esta familia de lipopéptidos es esencial para colonizar raíces y reducir la gravedad de la enfermedad causada por *Pseudomonas syringae*.

Las iturinas se la representa por la iturrina A, la micosubtilina y la bacilomicina, muestran una marcada actividad antifúngica (Saraf et al., 2014) convirtiéndose en un agente idóneo para el control biológico, contribuyendo a la reducción del uso de agroquímicos en la agricultura; un estudio realizado en BS UMAF6639 produce las tres familias de lipopéptidos (surfactinas, iturinas y fengicinas) dio como resultado que estos inhiben la germinación de las esporas (Sánchez, 2016).

Las fengicinas son un bioactivo producido por ciertas cepas de BS, poseen una fuerte actividad antifúngica contra hongos filamentosos (Saraf et al., 2014) y pueden realizar un doble rol para reducir enfermedades fitopatológicas en los cultivos, estos compuestos tienen la habilidad de actuar sobre la capacidad de defensa del hospedero mediante la acción directa del antagonista microbiano .

Los compuestos menos conocidos de la familia de los lipopéptidos son las fengicinas, se tiene entendido que estos pueden interactuar con las capas lipídicas y están asociados a cambios en la estructura y permeabilidad de la membrana celular, las cuales están vinculadas a las concentraciones correspondientes (Ley et al., 2022).

Estudios realizados por (Romero et al., 2007 citado por Saraf et al., 2014) demostraron la participación de los bioactivos iturina y fengicina en cuatro cepas de BS cepas: MAF6614, UMAF6616, UMAF6639 y UMAF8561 en la mitigación del mildiú polvoriento que afecta a las cucurbitáceas causado por *P. fusca*.

## CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

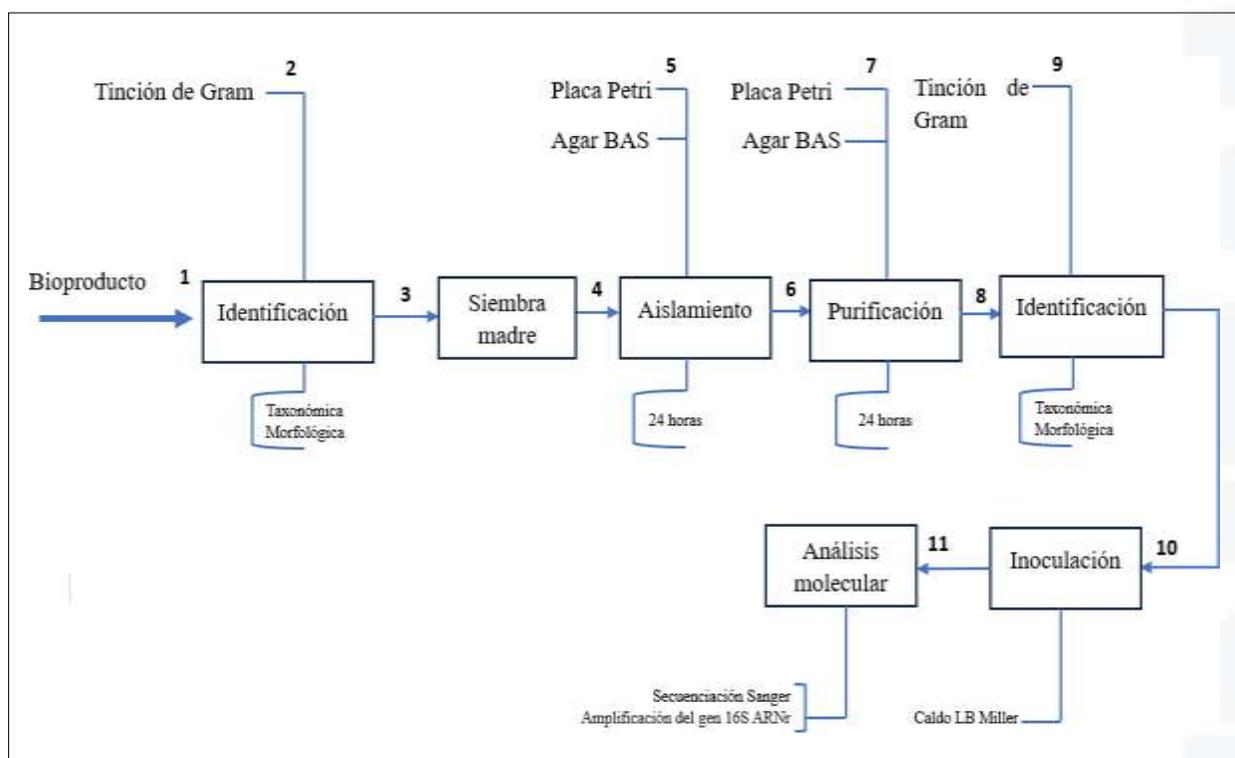
### 3.1. Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación de este proyecto fue de carácter experimental debido a que se propone la formulación de la cantidad adecuada de *Bacillus* spp. para el control preventivo de la enfermedad Sigatoka Negra, como una alternativa para incluirlo en un programa fitosanitario en el cultivo de banano.

El diseño de investigación en el área de laboratorio se realizó la siembra basándose en las normas NTE INEN 1529-2, (1999). A continuación, vemos en la Figura 1 el diagrama de siembra de *Bacillus* spp. para identificar la taxonomía y morfología:

**Figura 1**

Diagrama de proceso de siembra y aislamiento de la cepa *Bacillus* spp.

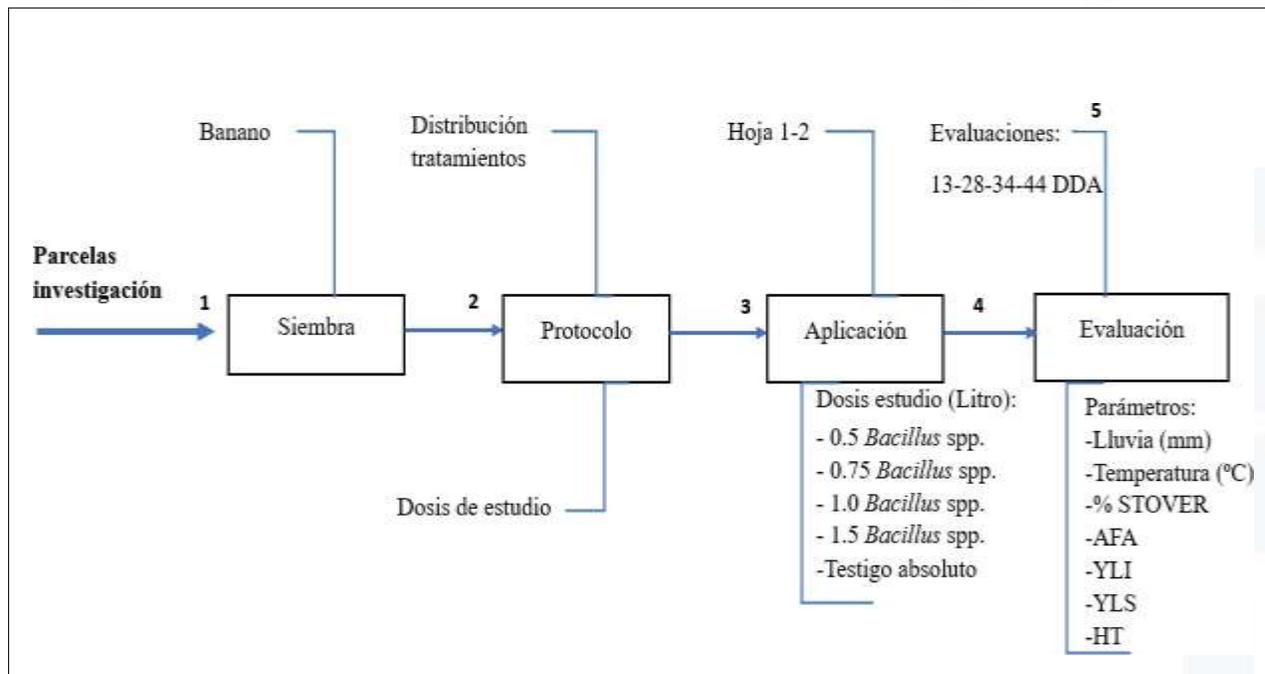


**Nota:** Diagrama de flujo del medio de cultivo y aislamiento de la cepa bacteriana.

En el diseño experimental de la investigación en campo se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), conformado por 5 tratamientos y 3 repeticiones. A continuación, vemos la Figura 2 el diagrama del proceso llevado a cabo:

**Figura 2**

Diagrama del proceso de establecimiento de la plantación y las evaluaciones de la aplicación del bioproducto.



**Nota.** Diagrama de flujo de la aplicación del bioproducto en las parcelas experimentales.

Para evaluar la eficacia de la acción del *Bacillus* spp. de cada tratamiento en estudio, se procedió a medir las siguientes variables en campo:

- Severidad % STOVER
- Área foliar afectada (AFA)
- Hoja más joven afectada (HMJA)
- Hoja libre de estría (HLE)
- Hojas Totales (HT)

## **3.2. La población y la muestra**

### **3.2.1. Características de la población**

La presente investigación está enfocada al cultivo de banano con la finalidad de tener alternativas viables con enfoque de sostenibilidad para reducir la carga química y que sean eficientes para el control de la enfermedad de Sigatoka Negra.

### **3.2.2. Delimitación de la población**

Hoy en día el mercado internacional exige al productor enfocarse a una agricultura sostenible, en el caso de banano a una producción orgánica que reduzca la carga química por hectárea y que los estándares de calidad proporcionen seguridad alimentaria al consumidor final, por ello la necesidad de dirigirse a una línea biológica.

### **3.2.3. Tipo de muestra**

El tipo de muestra que se aplicó está enfocado a un modelo probabilístico ya que se desarrolla mediante métodos inductivo, de observación, analítico y experimental, donde se establece un % de efectividad óptimo del microorganismo estudiado.

La cepa de *Bacillus* spp. corresponde a un producto donado de una empresa de insumos agrícolas a partir de esta investigación nos proporcionara información selectiva para el cultivo de banano y la dosis adecuada para el control preventivo de SN, adicional se realizó un análisis de tinción diferencial morfológico, microbiológico y molecular para verificar la filogenia de *Bacillus* spp.

### **3.2.4. Proceso de selección de la muestra**

La investigación realizada está enfocada en dos ambientes, uno en laboratorio y el segundo en campo para determinar la actividad antagonista de *Bacillus* spp. con la finalidad de obtener resultados que sean representativos y aplicables a la población de estudio, el cultivo de banano.

Para poder ejecutar el trabajo de investigación se necesitó seguir protocolos y el uso de materiales y equipos.

### **3.2.5. Materiales**

#### **3.2.5.1. Material biológico**

- Biopreparado de *Bacillus* spp.

#### **3.2.5.2. Equipos e instrumentos**

- Motobomba
- Mezcladora de bioproducto
- Probeta de 1000 ml
- Incubadora bioquímica B-OBASE modelo BJPX-B250KG
- Balanza analítica BOECO BAS 31 PLUS
- Autoclave Yamato modelo SM311
- Asas de siembra
- Cajas Petri de agar de sangre de cordero (BAS)
- Erlenmeyer 500 ml
- Papel aluminio
- Plástico filme
- Mechero de bunsen

#### **3.2.5.3. Reactivos**

- Cristal Violeta
- Alcohol cetona
- Lugol
- Safranina
- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Wizard® SV” de PROMEGA

### **3.3. Procedimientos de laboratorio**

Se procedió a esterilizar los materiales de vidrio previo a la inoculación del bioproducto.

### 3.3.1.1. Medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo en esta investigación, uno fue el agar sangre de cordero (BAS) para purificar la cepa de estudio y otro el Caldo LB Miller para la obtención de la biomasa de *Bacillus* spp...

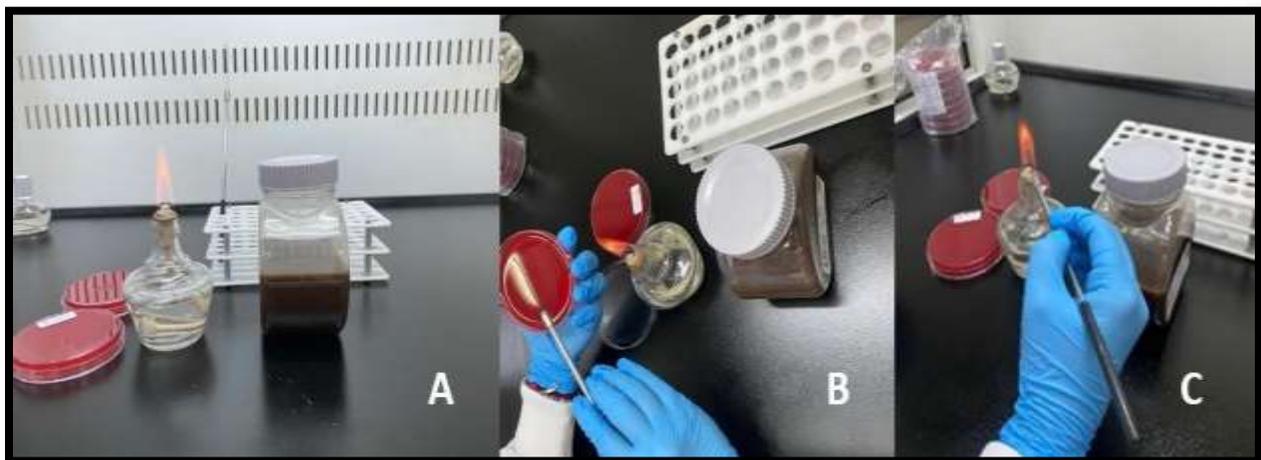
Para la preparación del caldo enriquecido se procedió a esterilizar el medio durante 15 minutos a 15 psi de presión y 121°C, luego que desciende la temperatura se procedió a inocular la muestra en estudio por un lapso de 30 horas a 37 °C. (Torres et al., 2013).

### 3.3.1.2. Procedimientos de la siembra del microorganismo por extensión de superficie

Se procedió a realizar la siembra del inóculo por extensión de superficie con el asa previamente estéril, en total se realizó dos repeticiones de la placa madre manteniendo condiciones de asepsia, (Corrales et al., 2014) (Figura 3).

### Figura 3

Fotos del proceso de siembra de la bacteria *Bacillus* spp.



**Nota.** (A) materiales para la siembra, (B) Siembra de la bacteria en cabina, (C) Esterilización del asa para proceder a la siembra.

Posteriormente, se realizó la diferenciación morfológica de la cepa madre mediante la técnica de tinción de Gram como lo vemos en la Figura 4 para asegurarnos de seleccionar la colonia adecuada que cumpla con las consideraciones técnicas. La caracterización y cuantificación del

estudio metagenómico se efectuó mediante la amplificación del gen 16S ARNr de la cepa bacteriana aislada en caldo LB.

#### Figura 4

Fotos de coloración de Gram



**Nota.** (A) Materiales y soluciones usadas para la tinción de Gram, (B) Proceso de fijación de placa, (C) Visualización de *Bacillus* spp. de la placa de tinción de Gram, (D) Aislamiento del *Bacillus* spp., en medio de cultivo Caldo LB Miller.

Para la extracción del material genético se hizo uso del kit comercial Wizard® SV” de PROMEGA, este proceso se llevó a cabo a partir de lisados utilizando una microcentrífuga siguiendo las indicaciones del fabricante; finalmente se obtuvo un volumen de 500 µl el cual se almacenó a -20 °C hasta su cuantificación (Torres et al., 2013).

#### 3.3.2. Tamaño de la muestra

Se tomaron un total de 15 plantas distribuidas en las parcelas de estudio de forma aleatoria para evaluar la actividad antagónica ejercida por *Bacillus* spp. frente a SN en el cultivo de banano, las mismas que fueron diagnosticadas durante un periodo de 13, 28, 34 y 44 días después de la aplicación del bioproducto de forma *in situ* (García, 2022). A continuación, en la Tabla 1 vemos la distribución de los tratamientos a evaluar:

#### Tabla 1

Distribución de los tratamientos

<b>Código</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis (Litro)</b>
<b>T1</b>	<i>Bacillus</i> spp.	0.5
<b>T2</b>	<i>Bacillus</i> spp.	0.75
<b>T3</b>	<i>Bacillus</i> spp.	1.00
<b>T4</b>	<i>Bacillus</i> spp.	1.5
<b>T5</b>	Testigo absoluto	

**Nota:** La muestra fue donada por una empresa de insumos agrícolas.

### 3.3.2.1. Procedimientos de campo

Previo a la aplicación del bioproducto, se procedió a realizar el protocolo y el mapa de distribución de campo, para continuar con la fumigación de la hoja 1-2 conocidas como hojas nuevas con una motobomba de dispersión uniforme (García et al., 2022). En la Tabla 2 se visualiza las mezclas de los tratamientos a evaluar simulando a 5 galones por hectárea

**Tabla 2**

Mezclas de los tratamientos evaluados

<b>Código</b>	<b>Dosis</b>	<b>Agua</b>	<b>Aceite</b>
<b>T1</b>	0.5	2	3
<b>T2</b>	0.75	2	3
<b>T3</b>	1.00	2	3
<b>T4</b>	1.5	2	3
<b>T5</b>	-	-	-

**Nota.** Las dosis utilizadas están en litros.

### 3.3.2.2. Parámetros evaluados en campo

En las parcelas de investigación se registró los parámetros de lluvia (mm), temperatura máxima y mínima semanalmente, por la relación patógeno-enfermedad del hongo hacia el cultivo de banano ya que estos parámetros van asociados al desarrollo del ciclo de vida de la enfermedad. Para determinar la incidencia (%) de la enfermedad SN se hizo uso de la siguiente fórmula (Orozco et al., 2013):

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{número hojas muestreadas con infección}}{\text{Total hojas muestreadas}} \times 100$$

Las variables evaluadas en campo fueron registradas en las semanas de estudio. Para la medición del porcentaje de área foliar afectada se lo realizó mediante el método de Stover, 1980 modificado por Gauhl en 1989, donde se evalúa los siguientes parámetros para determinar el % de afectación (Orozco et al., 2013):

- Hoja más joven afectada (HMJA)
- Hoja libre de estría (HLE).

Con estos dos parámetros se pudo comprender el grado epidemiológico de la enfermedad como el periodo de incubación y latencia, para obtener (%) de severidad, se emplea la siguiente expresión:

$$S = \frac{\sum niGi}{n}$$

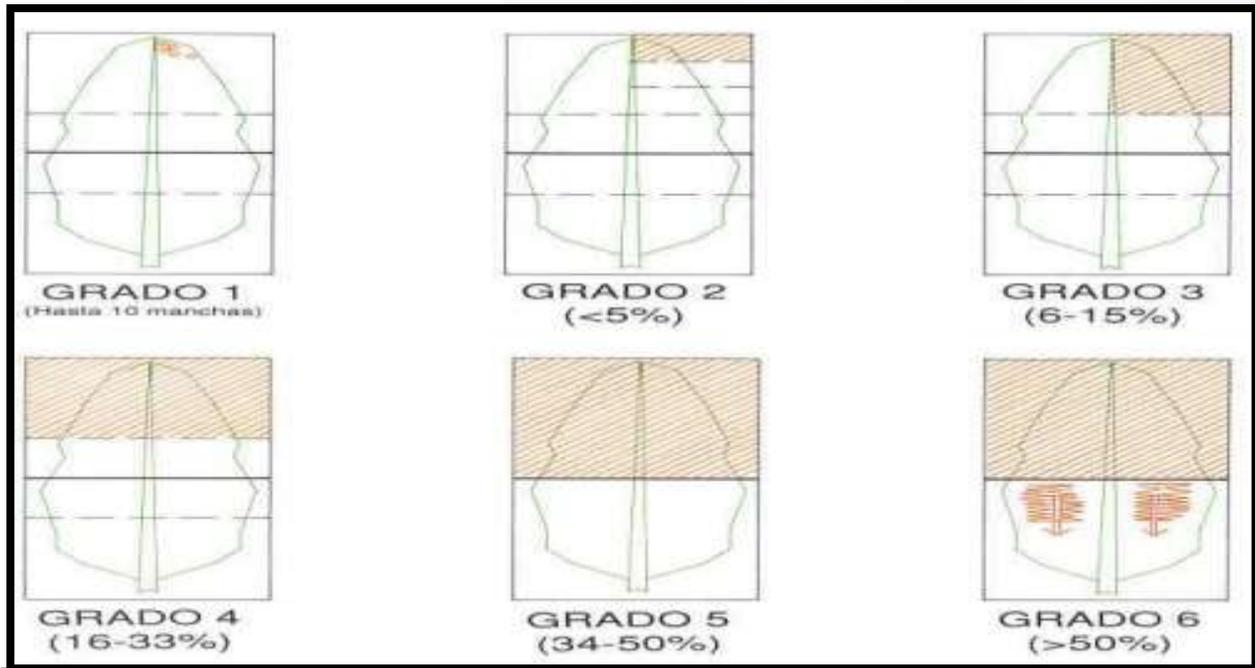
Donde:

- S= Severidad
- $n_i$ = Número de hojas afectadas dentro de un valor de escala otorgado.
- $G_i$ = Escala
- n= Hojas totales

Para la evaluación de la variable  $n_i$  se empleó la siguiente escala de severidad como se expresa a continuación en la Figura 5 (Orozco et al., 2013):

**Figura 5**

Grados de Severidad de Sigatoka negra



**Nota.** Escala de Stover modificada por Gauhl 1989.

Para evaluar la emisión foliar en el cultivo de banano, se observó el punto de crecimiento central de la planta, hoja cigarro como indica la Figura 6, es importante monitorear este desarrollo ya que el número y sanidad de las hojas es un punto crucial para el crecimiento productivo, además, permite tomar decisiones sobre el manejo preventivo de sigatoka negra en el cultivo banano (Quevedo et al., 2018).

**Figura 6**

Representación de los estados de desarrollo de la hoja cigarro en el cultivo de banano.



**Nota.** Determina el desarrollo de las hojas en un determinado tiempo.

### **3.4. Los métodos y las técnicas**

#### **3.4.1. Método Inductivo**

El tipo de investigación empleado permitió observar e identificar la taxonomía y morfología de la cepa bacteriana *Bacillus* spp., asegurando la pureza de la especie con el objetivo de cumplir los objetivos planteados.

#### **3.4.2. Método de la observación**

Para esta investigación se analizó la severidad de la enfermedad en el cultivo de banano y el área del progreso de la enfermedad durante 13, 28, 34 y 44 días después de aplicado (DDA) las distintas dosis del *Bacillus* spp.

#### **3.4.3. Método analítico y experimental**

Se estudió la eficacia del *Bacillus* spp. en distintas dosis para el control preventivo de Sigatoka Negra en el cultivo de banano, con las variables de estudio.

#### **3.4.4. Área de investigación**

La investigación realizada se enfoca en dos áreas, campo y laboratorio, con finalidad de tener un sustento genético.

El trabajo en laboratorio se lo realizó en los laboratorios del bloque de la Universidad Estatal de Milagro km 1.5 vía Kilometro 26- Milagro-Guayas-Ecuador.

El estudio en campo se lo llevo a cabo en la ciudad de Quevedo, Ecuador en las parcelas experimentales de la “Estación experimental de Banano Ecuador” Figura 7, ubicado km 4 ½ vía a Valencia de la parroquia San Carlos, provincia de los Ríos.

## Figura 7

Parcelas experimentales



**Nota.** (A) Revisión de los tratamientos de estudio, (B) Parcelas de los tratamientos de estudio.

### 3.5. Procesamiento estadístico de la información

Para el procesamiento de la información de los resultados obtenidos en campo, se realizó un análisis de varianza factorial entre grupos segmentados en cada evaluación mediante un análisis de varianza ANOVA con la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ ) utilizando el software IBM SPSS Statics 22 y el procesamiento de los datos se los efectuó en hojas de cálculo de EXCEL.

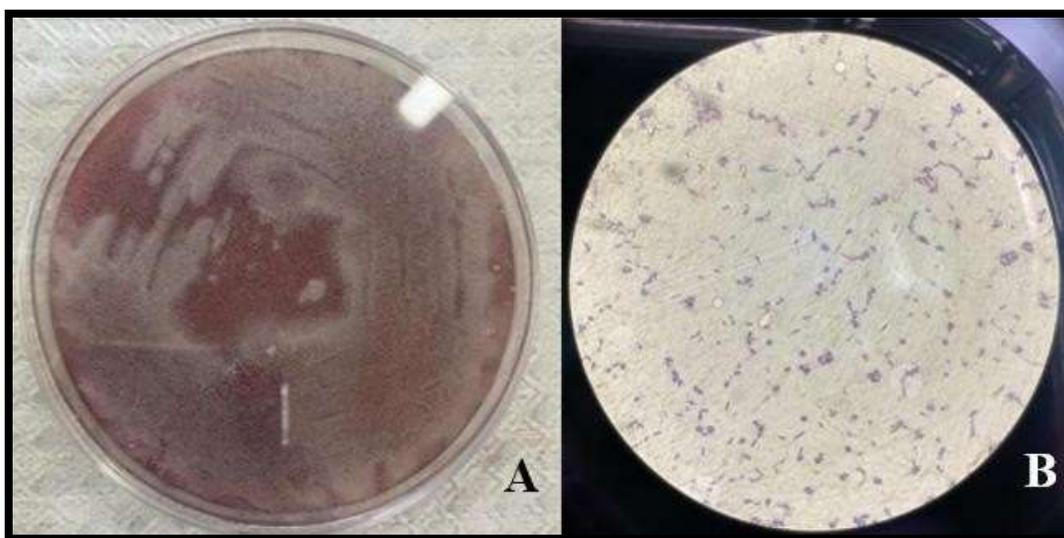
## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

### 4.1. Clasificación estadística del análisis morfológico

Previo al análisis metagenómico se procedió a purificar la cepa bacteriana en medio nutritivo agar BAS. Para la identificación morfológica se la realizó a través de tinción de Gram (Figura 8) de la placa madre inoculada durante 24 horas.

#### Figura 8

Identificación morfológica de *Bacillus* spp.



**Nota.** (A) Visualización del crecimiento de colonias a las 24 horas, (B) Visualización microscópica mediante tinción de Gram.

#### 4.1.1. Análisis del estudio del marcador 16S ARNr

Se identificó una región específica del gen 16 ARNr que es específico para bacterias en sitios V3-V4 para reconocer su clasificación taxonómica, encontrando 138.036 lecturas totales (PF) Tabla 3, siendo un valor alto que demuestra la calidad de la secuenciación.

**Tabla 3**Información de la muestra *Bacillus* spp.

<b>Lecturas totales</b>	<b>% Lecturas totales PF</b>
138,036	100

**Nota.** Lecturas totales de los análisis metagenómicos de la muestra en estudio.

Los resultados del análisis metagenómico están procesados en la plataforma Illumina con un algoritmo que detalla la significancia estadística, si se presenta menor al 3.50 % de abundancia se agrupan en categorías como otros, para simplificar la representación visual de los datos metagenómicos.

La tabla 4 representa la clasificación taxonómica del *Bacillus* spp. donde detalla el total de las categorías taxonómicas identificadas en la muestra, presentando las 8 principales especies de mayor a menor.

**Tabla 4**Identificación molecular de *Bacillus* spp.

<b>Clasificación</b>	<b>Total lecturas (%)</b>
<i>Bacillus</i> spp.	95.49
Sin clasificar a nivel de género	1.95
<i>Virgibacillus</i>	0.73
<i>Paenibacillus</i>	0.34
<i>Oceanobacillus</i>	0.30
<i>Salinibacillus</i>	0.07
<i>Ornithinibacillus</i>	0.06
<i>Geobacillus</i>	0.06

**Nota.** Taxonomía total a nivel de género (% total de lecturas).

En un estudio realizado por Yunlong et al., (2015) sobre el impacto de BS y un fungicida convencional en las cepas bacterianas presentes en el suelo rizosférico del cultivo de tabaco utilizando el análisis ARN ribosomal 16S, reportaron la reducción de la infección del agente causal *P. parasítica*, destacando que la abundancia de algunas comunidades favoreció especialmente a los filos dominantes ya que mediante el análisis ribosomal identificaron las categorías taxonómicas de forma minuciosa y sus porcentajes de predominancia.

Según Villarreal Delgado et al., (2018) menciona que a lo largo de la historia, la clasificación y diferenciación de especies dentro del grupo *Bacillus* se ha realizado tradicionalmente mediante el análisis del gen 16S ARN ribosomal, en su estudio hace énfasis que *Bacillus cereus* y *B. subtilis* son los más utilizados a nivel comercial.

#### 4.1.2. Clasificación por nivel taxonómico

La Tabla 5 detalla la clasificación taxonómica identificada a nivel de especie, mostrando las 8 principales especies de las 384 clasificaciones, encontrando el 96.98% de especies sin clasificar, BA con 1.19% del total de las lecturas mientras que las otras especies están por debajo del 1% de las lecturas analizadas.

**Tabla 5**

Principales categorías taxonómicas a nivel de género *Bacillus* spp

Clasificación	Total lecturas %
Sin clasificar a nivel de especie	96.98
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1.19
<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	0.19
<i>Bacillus siamensis</i>	0.14
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	0.14
<i>Virgibacillus</i> sp.	0.09
<i>Virgibacillus massiliensis</i>	0.07
<i>Bacillus coahuilensis</i>	0.06

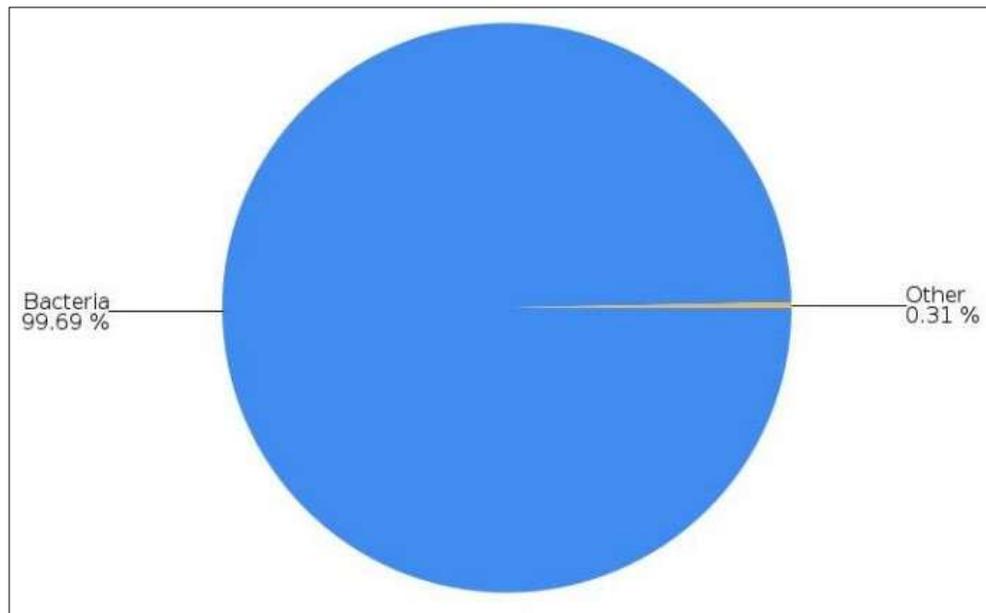
**Nota.** Total, de lecturas (%) de *Bacillus* spp.

### 4.1.3. Clasificación a nivel de Reino

El total de las lecturas a nivel de reino fueron 137.612 que corresponde al 99.69 % del total correspondiente al reino Bacteria como se observa en la figura 9 y el 0.31 % se refiere a sin clasificación a nivel de reino.

### Figura 9

Resultados de clasificación de reinos



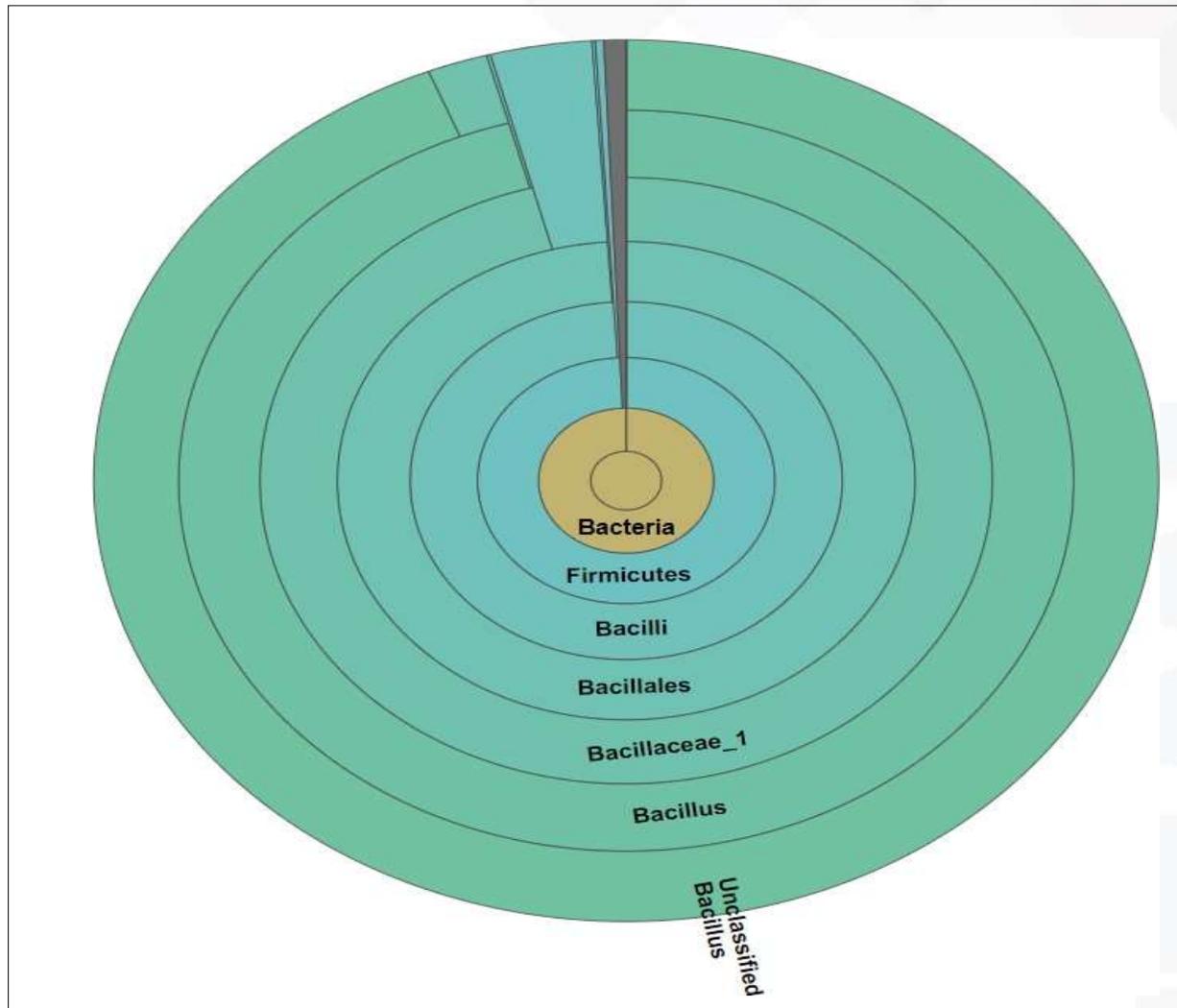
**Nota.** Other, es la sumatoria de las clasificaciones con menos del 3.50 % de la abundancia.

### 4.1.4. Clasificación de Rayos Solares

En la figura 10 del gráfico solar presenta la abundancia relativa de las clasificaciones en cada nivel taxonómico dentro del reino bacteria encontrado en la muestra.

**Figura 10**

Clasificación de rayos solares del reino Bacteria



**Nota.** En la clasificación de los resultados del reino Bacteria muestra la abundancia relativa a nivel taxonómica.

#### 4.1.5. Secuenciación de Sanger

Debido a la presencia de consorcios microbianos presentes en la muestra, no fue posible analizar el microorganismo de estudio, más bien se pudo observar la existencia de más de uno y por esa razón se genera el ruido como se observa en la figura 11.

## Figura 11

### Cronograma de electroforesis capilar



**Nota.** Ruido de consorcio microbiano por posible contaminación

Valderrama et al., (2020) menciona que el método de Sanger ha experimentado una amplia aceptación y desarrollo, destacándose como la técnica que permitió la fundación de la genómica mediante la primera secuencia completa de un genoma ADN. El avance tecnológico y

bioinformático ha impulsado el surgimiento de técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos, conocidas como secuenciación de próxima generación (NGS), provocando que técnicas de primera generación dejen de ser empleadas para la secuenciación de genomas completos. En la actualidad, el método de Sanger continúa siendo una técnica fundamental y requerida en los laboratorios que llevan a cabo la clonación molecular.

#### 4.2. Análisis de varianzas factorial entre grupos segmentados

En la Tabla 6 nos indica que existen diferencias altamente significativas entre las dosis de *Bacillus* spp. en función del índice de infección de Sigatoka negra en el cultivo de banano ya que todos los valores son menores al p-valor (0.05), conforme transcurría el tiempo de las evaluaciones (0-13-28-34-44) DDA, la severidad de la enfermedad (%) incrementaba en los tratamientos en estudio.

**Tabla 6**

Prueba de ANOVA de los índices de infección de Sigatoka Negra (%).

<b>Evaluación</b>		<b>p-valor</b>
<b>0 DDA</b>	Entre grupos	
	Dentro de grupos	
	Total	
<b>13 DDA</b>	Entre grupos	,000
	Dentro de grupos	
	Total	
<b>28 DDA</b>	Entre grupos	,000
	Dentro de grupos	
	Total	
<b>34 DDA</b>	Entre grupos	,000
	Dentro de grupos	
	Total	
<b>44 DDA</b>	Entre grupos	,000
	Dentro de grupos	
	Total	

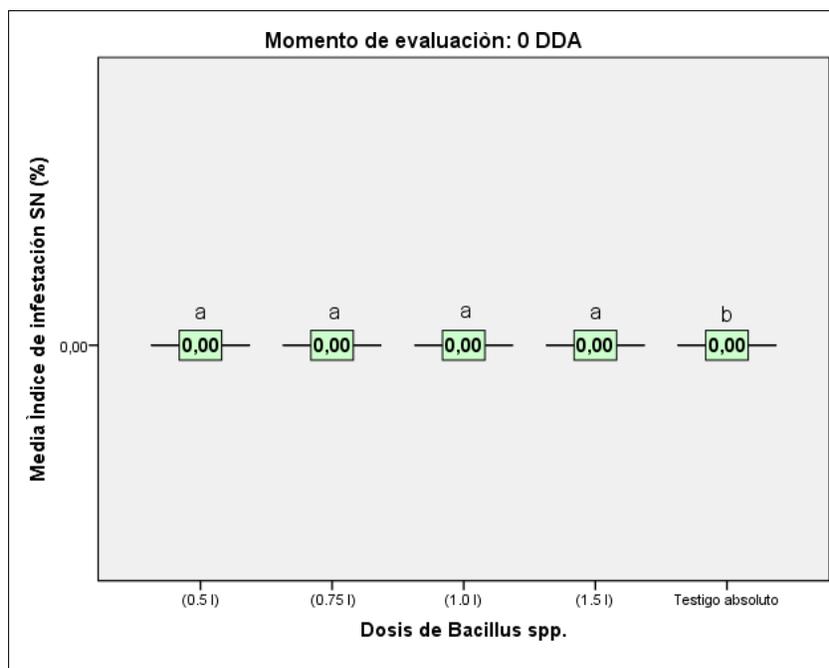
**Nota.** Índice de infección de Sigatoka negra p valor <0.05

#### 4.2.1. Análisis de varianza ANOVA con la prueba de Duncan ( $P \leq 0.05$ )

En la figura 12 representa el inicio de la investigación en las parcelas experimentales donde el parámetro del índice de infección de la enfermedad Sigatoka negra (%) es igual en todos los tratamientos en estudio, siendo fundamental este parámetro en las parcelas en estudio.

#### Figura 12

Índice de infección de Sigatoka negra a los 0 DDA.

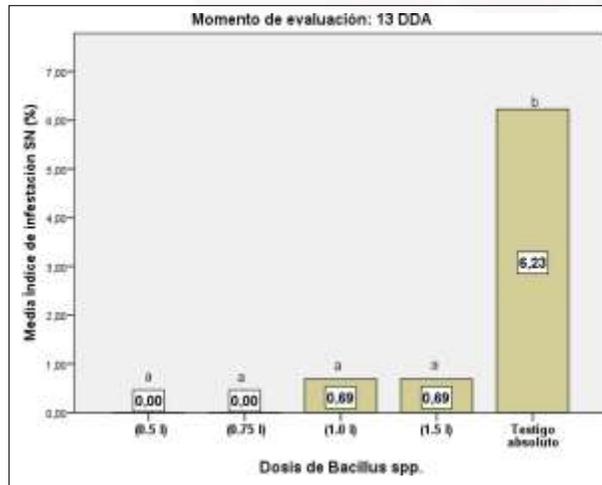


**Nota.** La gráfica de media de índice de infección muestra el (%) de severidad 0 DDA.

La severidad de incidencia de Sigatoka negra a los 13 días después de aplicado (DDA) el biofungicida se observa que no hay diferencias significativas entre las dosis de los distintos tratamientos, pero en el testigo absoluto se visualiza el inicio de la severidad con 6.23% de infección versus a los tratamientos en estudio figura 13.

**Figura 13**

Índice de infección de Sigatoka negra a los 13 DDA.

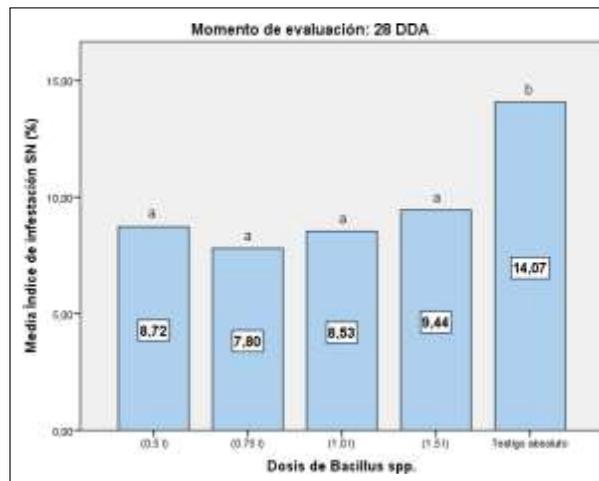


**Nota.** La gráfica de media de índice de infección muestra el (%) de severidad 13 DDA.

Como se observa en la Figura 14 del análisis de varianza indica que existe un tratamiento distinto estadísticamente al resto de los tratamientos en estudio. Con la prueba de Duncan al (0.05), se evidencia que el Tratamiento 5 el (%) de severidad es mayor con 14.07, evidenciando que el índice de infección conforme pasa los días de las evaluaciones la severidad es superior en T5 (Testigo absoluto).

**Figura 14**

Índice de infección de Sigatoka negra a los 28 DDA.

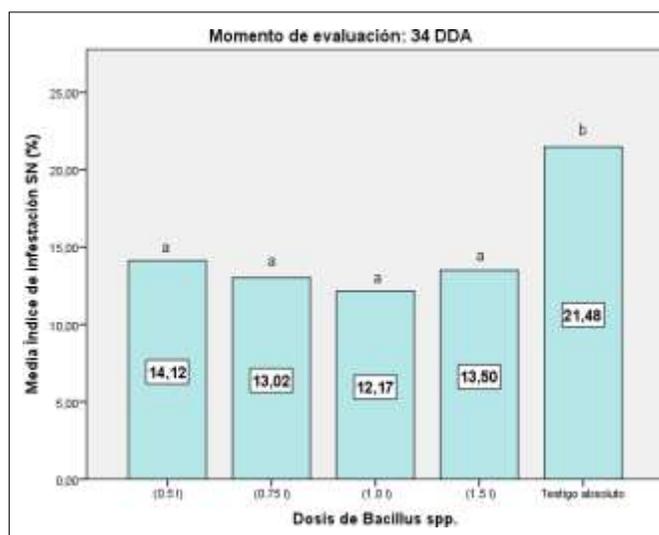


**Nota.** La gráfica de media de índice de infección muestra el (%) de severidad 28 DDA.

En la figura 15 se visualizan dos subgrupos a y b, donde “a” representan a los tratamientos con distintas dosis del *Bacillus* spp. mientras “b” al testigo absoluto, demostrando que a los 34 DDA tiene 21.48% de índice de infección de SN, seguido del T1 con 14.12% de severidad.

### Figura 15

Índice de infección de Sigatoka negra a los 34 DDA.

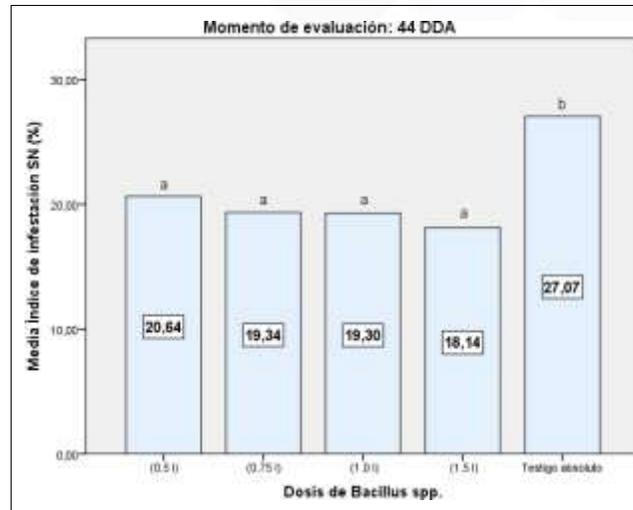


**Nota.** La grafica de media de índice de infección muestra el (%) de severidad 34 DDA.

En la figura 16 se observa que no hay diferencias estadísticas entre las dosis evaluadas, T4 tiene 18.14% de infección, T3 un 19.30%, T2 alcanzó un 19.34% severidad y T1 un 20.64% de infección a nivel foliar, existiendo un 2.5 % de diferencias entre los tratamientos con distintas dosis a los 44 días después de la aplicación del biofungicida, siendo el T5 el testigo absoluto el área foliar más afectada con 27.07%.

## Figura 16

Índice de infección de Sigatoka negra a los 44 DDA.



**Nota.** La gráfica de media de índice de infección muestra el (%) de severidad 44 DDA.

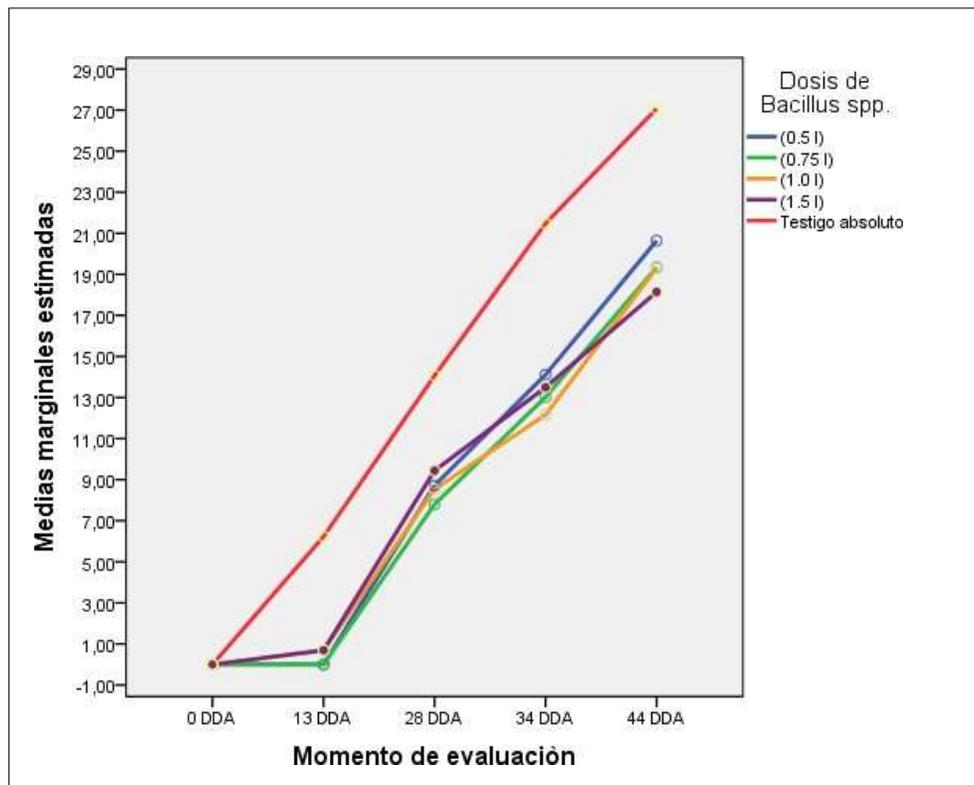
Gutierrez et al., (2015) evaluó el efecto de un biofungicida a base de *Bacillus subtilis* cepa EA-CB0015 y sus metabolitos para el control de *M. fijiensis* en condiciones de campo e invernadero, a una dosis de 1.5 L/ha suspensión en agua, logrando reducir la severidad de la enfermedad SN entre un 20.2% y 28.1%, siendo reducciones comparables a las obtenidas de fungicidas convencionales como chlorotalonil y mancozeb. Adicional observó que el fungicida microbiano a 1.5 L/ha demostró efectividad cuando se lo aplica en combinación con fungicidas sistémicos reduciendo hasta un 42.9% en un programa de fumigación.

Villarreal et al., (2018) en su estudio sobre el género *Bacillus* spp. como agente de control biológico, menciona la gran diversidad metabólica de este taxón para controlar biológicamente a los fitopatógenos, se puede observar a nivel comercial una gama de formulaciones teniendo como ingrediente activo cepas de *Bacillus*, se destaca por su capacidad de colonización, reproducción sencilla y una notable persistencia atribuida a la formación de endosporas, siendo esta característica particularmente relevante ya que les confiere la capacidad de sobrevivir en condiciones de estrés abiótico y fácil producción, contribuyendo a su viabilidad y utilidad a largo plazo.

En la figura 17 se visualiza la curva % área foliar afectada por Sigatoka negra en las parcelas de estudio en los momentos de evaluación 0, 13, 28, 34 y 44 días después de aplicado el biofungicida, observando que los tratamientos con las distintas dosis se mantienen en valores cercanos entre si mientras el testigo absoluto el % de infección a nivel foliar se incrementa conforme transcurre el tiempo, recalcando que *Bacillus spp.* controla SN.

**Figura 17**

Porcentaje de área foliar afectada por Sigatoka negra



**Nota.** Evaluaciones de los tratamientos en estudio.

Según Castillo, (2022) el tratamiento de *Trichoderma sp.* + *B. subtilis* ejerció un mejor control sobre Sigatoka negra teniendo como severidad un 30.26% y el tratamiento de *Bacillus subtilis* un 38.93% de índice de infección.

Según García et al, (2022) evidencio como estrategia de control que incorporar fungicidas microbiológicos a base de *B. amyloliquefaciens* es una alternativa eficaz que puede incluirse en un

programa de fumigación para el control de Sigatoka negra, debido que los resultados obtenidos revelaron una superioridad estadística respecto a los demás tratamientos evaluados.

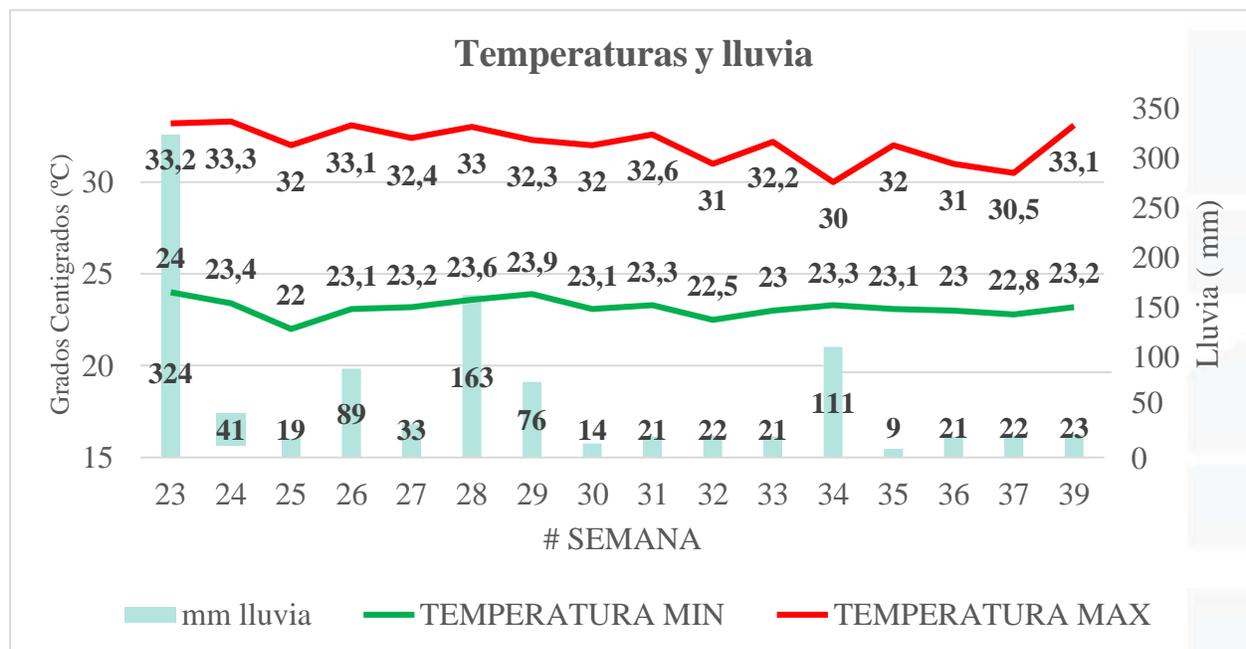
#### 4.2.2. Variables climáticas y fenológicas del cultivo de banano

Los parámetros climáticos son de vital importancia en un estudio porque afectan directa e indirectamente al cultivo en estudio y sobre todo con la enfermedad Sigatoka negra que esta influenciadas por condiciones de lluvia, temperatura, humedad entre otros parámetros que afectan a la propagación de le enfermedad y ciclo de vida del hongo.

En la figura 18 de temperaturas y lluvia visualizamos el comportamiento de estos parámetros desde la semana 23 referente a la época de verano desde el inicio de la siembra. La temperatura máxima fluctuaba entre 30 - 33.3°C y la mínima entre 22 – 24 °C, en lo referente a las lluvias en la semana 23 se observa la mayor cantidad de lluvia con 324 mm y al finalizar el ensayo en campo en la semana 39 con 23 mm, acumulando un total de 1009 mm en las parcelas de estudio.

**Figura 18**

Comportamiento de las temperaturas y lluvias en el sitio de estudio



**Nota.** Parámetros evaluados en la parcela experimental.

Según Aguirre et al., (2012) evidenció una correlación positiva entre la incidencia de la enfermedad con el clima y las propiedades edáficas, temperaturas entre 20-35 °C favorecen a la germinación de ascosporas y conidios del hongo.

En un estudio realizado por Benavides et al., (2022) menciona que existe una correlación directa de *P. fijiensis* con la lluvia, la temperatura, la humedad relativa, la radiación solar, favoreciendo al hongo desde cuando esta en estado de candela.

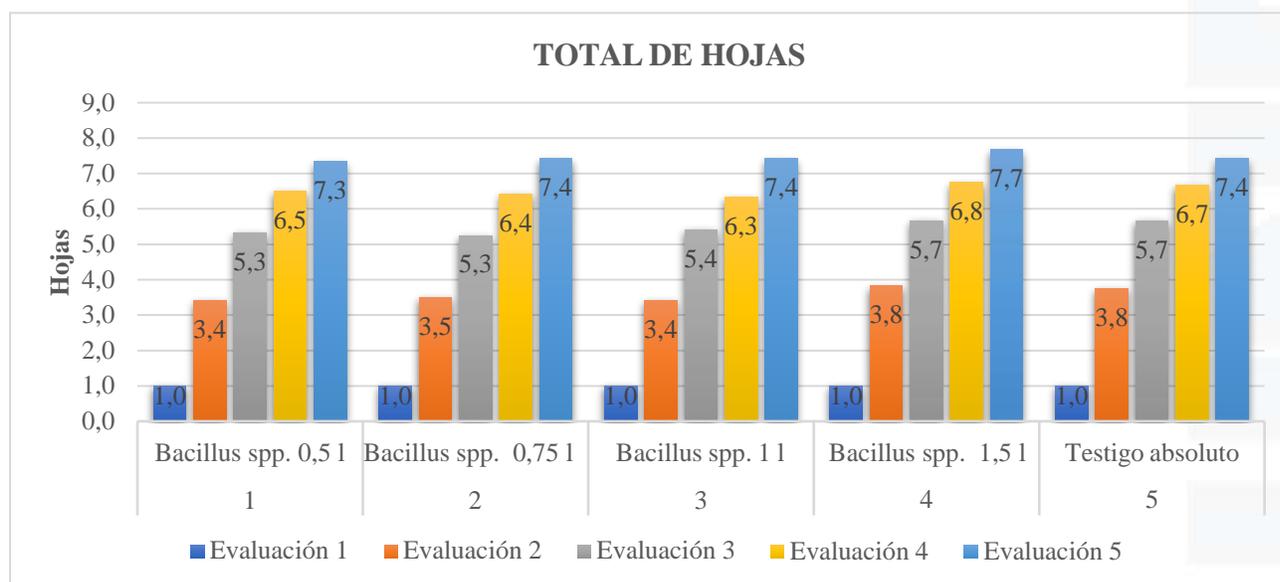
Según Rodríguez et al., (2021) señala que las variables climáticas como lluvia (mm), humedad relativa (%) también el control fitosanitario y las prácticas culturales influyen en la evolución del ciclo del hongo directamente.

#### 4.2.3. Variable de emisión foliar

En la figura 19 se visualiza el ritmo de emisión foliar de cada uno de los tratamientos en estudio, de acuerdo a las evaluaciones registrada desde los 0-13-28-34-44 días después de aplicado el biofungicida, teniendo una hoja nueva en 6 días promedio. No existen diferencias entre los tratamientos ya que la emisión foliar es paralela.

**Figura 19**

Emisión foliar de cada uno de los tratamientos



**Nota.** Ritmo de emisión foliar de los tratamientos durante el periodo de estudio.

Quevedo et al., (2018) menciona que la emisión foliar es un registro técnico indispensable para determinar el desarrollo de las hojas en un periodo específico, esta variable está relacionada con las aplicaciones nutricionales que pueden favorecer a acelerar a la emisión de nuevas hojas.

Según Rodríguez et al., (2021) indica que la variable emisión foliar es necesaria para el registro de preaviso biológico, método donde se monitorea plantas jóvenes y entre los datos necesarios es el ritmo foliar del sitio muestreado y así determinar que producto aplicar para el control de sigatoka negra.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

- El análisis microscópico de la muestra estudiada mediante la diferenciación microbiana demostró ser bacterias Gram positivas con morfología en forma de bastón entre 0.5 y 0.10  $\mu\text{m}$  de tamaño.
- Los análisis metagenómicos de la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal del biofungicida, proporcionó información detallada de la clasificación taxonómica, encontrando 324 categorías a nivel de género.
- Las categorías taxonómicas a nivel de especie del biofungicida fueron en total 384, de las cuales se destacan, *B. amyloliquefaciens* (1.19%), *Virgibacillus* (0.19%), *B. siamensis* (0.14%), no clasificado a nivel de especie (96.98%), entre otras bacterias en menor proporción.
- No fue posible determinar una cepa mediante el método de Sanger debido al ruido generado por el consorcio microbiano presente.
- Existen diferencias significativas entre las dosis estudiadas siendo el T4 el más efectivo versus a los otros tratamientos durante el tiempo de estudio, a medida que transcurre el tiempo el efecto del biofungicida en el control de Sigatoka negra es notorio, ya que el índice de infección disminuye.
- Los resultados obtenidos en la investigación confirman la eficacia del biofungicida *Bacillus* spp. en el control de Sigatoka negra, teniendo una herramienta efectiva para integrar en campañas de fumigación en el cultivo de banano.
- Entre los tratamientos de estudio no se encontró diferencias en la variable de ritmo de emisión foliar, ya que todos fueron trabajados de forma uniforme para evitar alteraciones estadísticas.

## 5.2. Recomendaciones

- Se recomienda replicar el estudio de campo en la época de invierno para determinar los días control del biofungicida con los tratamientos establecidos en la investigación para el control de Sigatoka negra.
- Realizar una siembra *in vitro* comparando las diferentes dosis de *Bacillus* spp. planteadas en el estudio para comparar los resultados de laboratorio con los de campo.
- En el proceso de purificación de la cepa, se podría ampliar este procedimiento para tener información taxonómica y morfológica de la bacteria en estudio.
- Realizar un estudio metagenómico completo del bioproducto para conocer el género y especie, debido que en la muestra se encontró el 96.98 % de *Bacillus* spp. de especies sin clasificar.

## 6. Referencias

- Abdel Samad, R., Al Disi, Z., Mohammad Ashfaq, M. Y., Mohiddin Wahib, S., & Zouari, N. (2020). The use of principle component analysis and. *Royal Society of Chemistry* (10), 14606-14616. doi:10.1039/D0RA01229G
- Aguilar Ancota, R., Arévalo Quinde, C. G., Morales Pizarro, A., & Galecio Julca , M. (2021). ongos asociados a la necrosis de haces vasculares en el cultivo de banano orgánico: síntomas, aislamiento e identificación, y alternativas de manejo integrado. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 249-256. doi:10.17268/sci.agropecu.2021.028
- Aguirre Forero, S. E., Piraneque Gambasica, N. V., & Menjivar Flores, J. C. (2012). Relación entre las propiedades edafoclimáticas y la incidencia de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en la zona bananera del Magdalena-Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2).
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Ailloud, F., Lowe, T., Cellier, G., Roche, D., Allen, C., & Prior, P. (2015). El análisis genómico comparativo de *Ralstonia solanacearum* revela genes candidatos para la especificidad del huésped. *BMC Genomics*, 16(270). doi:10.1186/s12864-015-1474-8
- Álavrez , E., Pantoja, A., Gañán, L., & Ceballos, G. (2013). *Estado del arte y opciones de manejo del Moko y la Sigatoka negra en América Latina y el Caribe*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Alcaraz, L. D., Moreno, H. G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera Estrella, L., & Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *Genomic BMC*, 11:332. doi:10.1186/1471-2164-11-332
- Alvarez, E. C., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), 53-62.
- Amaresan , N., Senthil Kumar, M., Annapurna, Kumar , K., & Sankaranarayanan, A. (2020). Beneficial Microbes in Agro-Ecology. En *Bacteria and Fungi*. doi:10.1016/C2020-0-00594-3

- Anchundia, D. M., Cunuhay, J. P., & Morán, R. P. (2021). Análisis económico del banano orgánico y convencional en la provincia Los Ríos, Ecuador. *Avances*, 23(4), 419-430.
- Angulo Cortés, J., García Díaz, A., Pedroza, A. M., Martínez Salgado, M. M., & Gutiérrez Romero, V. (2012). Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *Universitas Scientiarum*, 17(1), 43-52. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-74832012000100005&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832012000100005&lng=en&tlng=es).
- Apolinario Quintana, R., Olivero Arias, E., & Alvarado Márquez, M. (2015). La competitividad del banano ecuatoriano con el uso de tecnologías más limpias en su cultivo. *Revista Universidad de Guayaquil*, 121(3), 17-22. doi:10.53591/rug.v121i3.377
- Ayala, A., Colina, M., Molina, J., Vargas, J., Rincón, D., Jairo, . . . Cárdenas, H. (2014). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL QUITOSANO CONTRA EL HONGO *Mycosphaerella Fijiensis* Morelet QUE PRODUCE LA Sigatoka negra QUE ATACA EL PLÁTANO. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(6), 312-338.
- Barekye, A. (2009). Breeding investigations for black Sigatoka resistance and associated traits in diploids, tetraploids and the triploid progenies of bananas in Uganda. *Tesis Doctoral*. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/279353721>
- Barrera V, J., Barraza A, F., & Campo A, R. (2016). Efecto del sombrero sobre la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en cultivo de plátano cv Hartón (*Musa AAB Simmonds*). *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 317-323.
- Baudhuin, L. M., Lagerstedt, S. A., Klee, E. W., Frada, N., Oglesbee, D., & Ferber, M. J. (2015). Confirmación de variantes en pruebas de panel de secuenciación de próxima generación mediante secuenciación Sanger. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(4), 456-461. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.03.004
- Bautista, E. J., Mesa, L., & Alvarez, M. I. (2018). Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. *Scientia Agropecuaria* 9(4), 585-604.
- Becker, P., Esker, P., & Umaña, G. (2021). Incorporation of microorganisms to reduce chemical fungicide usage in black sigatoka control programs in Costa Rica by use of biological fungicides. *Crop Protection*, 146.

- Beckerman, J. L. (2013). Detection of Fungicide Resistance. En *Fungicides – Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World* (págs. 281-310). INTECH.
- Benavides López, L. F., Camacho Calvo, M., & Muñoz Fonseca, M. E. (2022). Relación entre factores climáticos y la infección foliar de Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*) en plantas de banano (*Musa AAA*) con y sin la aplicación de fungicida. *Revista AgroInnovación en el Trópico Húmedo*, 3(1), 2-13. doi:10.18860/rath.v3i1.6503
- Bharadwaj, A., Wahi, N., Nehra, N., Gupta, M., Gaurav, P., & Bhatia, A. K. (2014). Biorremediación: un enfoque ecológico para el tratamiento Pesticidas. *Adv. Biores*, 7(3), 200-206.
- Bonaterra, A., & Montesinos, E. (2020). *Manejo integrado de enfermedades de las plantas causadas por bacterias fitopatógenas*. Madrid: CIDSAV.
- Buitrago, R. B., Bashan, L. E., & Pedraza, R. O. (2021). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal; en sistemas de agricultura sostenible. Colombia: AGROSAVIA. doi:doi.org/10.21930/agrosavia.
- Campo Arana, R. O., Vélez Leiton, S. M., & Barrera, J. L. (2020). LA SIGATOKA NEGRA *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, EN LOS CULTIVOS DE PLÁTANO Y BANANO: UNA REVISIÓN. *Fitopatología Colombiana* 44(2), 61-66.
- Carmona, M., & Sautua, F. (2017). LA PROBLEMÁTICA DE LA RESISTENCIA DE HONGOS A FUNGICIDAS. CAUSAS Y EFECTOS EN CULTIVOS EXTENSIVOS. *Revista de la Facultad de Agronomía UBA*, 37(1), 1-18.
- Castillo Arévalo, T. (2022). Biological strategies for the management of Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* M.) in plantain cultivation (*Musa paradisiaca* L.) AAB in Rivas, Nicaragua. *Revista Colegiada de Ciencia*, 4(1), 106-115.
- Cedeño Zambrano José Randy, E. J.-B.-L.-Á.-V.-M.-G.-C.-U. (2021). Evaluación de la severidad de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano “Barraganete” bajo fertilización con magnesio. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería*, 4-11. doi:https://doi.org/10.22209/rt.v44n1a01
- CFN. (2020). *Ficha sectorial: Banano y plátano* . Obtenido de <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2020/ficha-sectorial-4-trimestre-2020/FS-Banano-4T2020.pdf>

- Chun, B. H., Kim, K. H., Jeong, S. E., & Jeon, C. O. (2019). Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group— *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*— revealed by pan-genome analysis. *Food Microbiology*, *77*, 146-157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.001>.
- Corrales Ramírez, L. C., Sánchez Leal, L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *Nova*, *12*(22). Obtenido de [www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702014000200006&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702014000200006&lng=en&tlng=es).
- Coute, F., Lecouturier, D., Dimitrov, K., Guez, J.-S., Delvigne, F., Dhülster, P., & Jacques, P. (2017). Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. *Biotechnol J.*, *12*(7). doi:10.1002/biot.201600566
- Craenen K, O. R. (1997). Effect of the *bs1* gene in plantain-banana hybrids on response to black Sigatoka. . *Theoretical and Applied Genetics*, 497-505.
- Cruz, P. S., Romanova, E. V., Guamán, R. N., Cortázar, a. M., & Abril, Á. F. (2023). Caracterización morfológica y bioquímica de *Ralstonia solanacearum* raza 2, bacteria patógena en cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, Ecuador. *Siembra*, *10*(1). doi:10.29166/siembra.v10i1.4305
- Dalia Aiello, G. R. (2022). Una nueva estrategia para mejorar el tratamiento de la enfermedad de Citrus Mal Secco utilizando bioformulados basados en cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*. *Plants*, *11*, 446. doi:<https://doi.org/10.3390/plants11030446>
- Dos Santos Nascimento, F., Moreira Sousa, Y., de Jesus Rocha, A., Fortes Ferreira, C., Haddad, F., & Perito Amorim, E. (2020). Sources of black Sigatoka resistance in wild banana diploids. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *42*. doi:<https://doi.org/10.1590/0100-29452020038>
- Duchen, D. G., & Torres, J. M. (2021). Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, *8*(2), 87-101. doi:<https://doi.org/10.53287/uyxf4027gf99e>
- Dunlap, C. A. (2019). Taxonomy of registered *Bacillus* spp. strains used as plant pathogen antagonists. *ELsevier*, 82-86. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.04.011>
- Esquivel Cote , R., Gavilanes Ruiz, M., Cruz Ortega , R., & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista*

- fitotecnia mexicana*, 36(3), 251-258. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802013000300010&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000300010&lng=es&tlng=es)
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 170. doi://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105860.
- FRAC. (2018). *Comité de Acción contra la Resistencia a Fungicidas*. Recuperado el 13 de 01 de 2024, de [https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/banana-group/group/banana-wg-meeting-minutes-2018---spanish.pdf?sfvrsn=f5ae489a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/banana-group/group/banana-wg-meeting-minutes-2018---spanish.pdf?sfvrsn=f5ae489a_2)
- Fratoni, M., A., M., L.A.C., M., L.H.C., A., & J.C.R., P. (2017). Efecto de la fertilización con nitrógeno y potasio en plantas de banano cultivadas en la Amazonía tropical húmeda. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1511-1519. doi:https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1373791
- Frigolet, M. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2017). Ciencias “ómicas”, ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud? *Revista Digital Universitaria*, 18(7).
- Galaviz Silva, L., Iracheta Villarreal, J. M., & Molina Garza, Z. J. (2018). Cepas de Bacillus y Virgibacillus aisladas de tres costas mexicanas antagonizan Staphylococcus aureus y Vibrio parahaemolyticus. *FEMS Microbiology Letters*, 365(19). doi:10.1093/femsle/fny202
- Gallez, L., Fernández, L., & Cibanal, I. (2017). Propóleos: su uso como biofungicida agrícola. *Ciencia Hoy*, 26(155).
- García Sánchez, H. M. (2022). Fungicidas a base de azufre y bacillus sp. en manejo integrado de Sigatoka Negra. *Revista Científica Agroecosistemas*, 153-158.
- García, R. O., Kerns, J. P., & Thiessen, L. (2019). Complejo de especies de Ralstonia solanacearum : una guía de diagnóstico rápido. *Plant Health Progress*, 20, 7-13. doi:https://doi.org/10.1094/PHP-04-18-0015-DG
- González Franco, G. A. (2021). 08-11-2021 Exploración de microbiomas en animales. *Asociación Poblana de Ciencias Microbiológicas (APCM)*. Zenodo. doi:.5281/zenodo.56557588
- González León, L., Rizo Porro, M., & Arenal Cruz, A. (2022). Bacillus firmus: aplicaciones y potencialidades como probiótico en la acuicultura. *Revista de Producción Animal*, 34(2). Obtenido de <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4213>

- González Ordóñez, A. n. (2018). Prácticas ambientales y competitividad de las PYMESbananeras del cantón Machala, provincia el Oro, Ecuador. *Revista Dilemas Contemporáneos* (6), 1-21.
- Grady , E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z. C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact*, 15(203). doi:10.1186/s12934-016-0603-7
- Gutarra, L., Herrera, J., Fernández, E., Kreuze, J., & Lindqvist-Kreuze, H. (2017). Diversidad, patogenicidad y aparición actual de la marchitez bacteriana *Ralstonia solanacearum* en el Perú. *Ciencia vegetal.*, 8(1221). doi:10.3389/fpls.2017.01221
- Gutierrez Monsalve, J. A., Mosquera, S., González Jaramillo, L. M., Mira, J. J., & Villegas Escobar, V. (2015). Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture. *Biological Control*, 87, 39-46. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.04.012.
- Guzmán Álvarez, J., González Zuñiga , M., Fernandez, J., & Calvo Alvarado, J. C. (2022). Uso de sensores remotos en la agricultura: aplicaciones en el cultivo del banano. *Agronomía Mesoamericana*, 33(3). doi:10.15517/am.v33i3.48279.
- Hernández Rodríguez , A., Ruíz Beltran , Y., Acebo Guerrero, Y., Miguélez Sierra , Y., & Heydrich Pérez, M. (2014). Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L: Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 11-19.
- Hollomon, D. W. (2015). Fungicide Resistance: 40 Years on and Still a Major Problem. *Springer* , 3-11. doi:10.1007/978-4-431-55642-8\_1
- INTAGRI. (2018). *INTAGRI*. Recuperado el 13 de 01 de 2024, de <https://www.intagri.com/articulos/frutales/manejo-de-la-sigatoka-negra-en-banano>
- Ladurner, E. ..., Fiorentini, F. ..., Lucchi, A. ..., Piergiacomini, M. ..., & Benuzzi, M. (2016). *Bacillus amyloliquefaciens* cepa D747 (Amylo-X®): ensayos de control contra oídio en pimiento morrón, *Monilinia laxa* en albaricoque y *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* sobre nectarina. *Atti, Giornate Fitopatologiche, Chianciano terme (Siena), 8-11 de marzo de 2016, Volumen segundo*. (págs. 155-162). Alma Mater Studiorum, Università di Bologna. Obtenido de <http://www.giornatefitopatologiche.it...>

- Ley López, N., Basilio Heredia, J., San Martín Hernández, C., Ibarra Rodríguez, R., Angulo Escalante, M., & García Estrada, R. S. (2022). Biosíntesis inducida de fengicina y surfactina en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad oomicetocida sobre zoosporas de *Phytophthora capsica*. *Revista argentina de microbiología*, 54(3), 91-100. Obtenido de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412022000300091&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412022000300091&lng=es&tlng=es).
- Magdama, F. (2019). FUSARIUM OXYSPORUM - EL HONGO MÁS TEMIDO EN LA INDUSTRIA DEL BANANO. *Revista Científica Ecuatoriana*, 6(1), 19-22. Obtenido de <https://revistaecuadorestabilidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestabilidad/index.php/revista/article/view/61>
- Manzo Sánchez, G., Orozco Santos, M., Martínez Bolaños, L., Garrido Ramírez, E., & Canto Canche, B. (2014). Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa sp.*) en México. *Revista mexicana de fitopatología*, 32(2), 89-107. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092014000200089&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200089&lng=es).
- MCOMEX. (04 de 01 de 2017). *Ministerio de Comercio Exterior e Inversiones de Ecuador. Informe sector bananero ecuatoriano*. Recuperado el 10 de 11 de 2023, de <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2019/06/Informe-sector-bananoespa%C3%B1ol-04dic17.pdf>
- McSpadden Gardener, B. B. (2004). Ecología de *Bacillopaenibacillo* especies en Sistemas Agrícolas. *PHYTOPATHOLOGY*, 94(11), 1252-1258.
- Megan C. Morgan, M. B. (2009). Comparison of the Biolog OmniLog Identification System and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical bacteria of clinical origin. *Microbiological Methods*, 336-343. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.10.005>.
- Mena Espino, X., & Couoh Uicab, Y. (2015). Efectos de los plaguicidas utilizados para el control de la Sigatoka negra en plantaciones bananeras en México, así como su efecto en el ambiente y la
- Nehra, V., Singh, B., & Choudhary, M. (2016). Evaluación de *Brevibacillus brevis* como rizobacteria potencial promotora del crecimiento vegetal para el cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *SpringerPlus*, 5(948). doi:10.1186/s40064-016-2584-8

- Ngalimat , M. S., Yahaya Radin, S. R., Yaminudin, S. M., Karim, M., Sabri, S., Ahmad, S. A., & Baharudin Al adil, M. M. (2021). Una revisión de las aplicaciones biotecnológicas del grupo operativo *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, 614.  
doi:10.3390/microorganisms9030614
- N'Guessan, C. A., Brisse, S., Roux-Nio, A.-C. L., Poussier, S., Koné, D., & Wicker, E. (2013). Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 366-374. doi:10.1016/j.mimet.2013.01.012.
- Niazi A, M. S.-R. (2014). Análisis del genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* Subsp. *plantarum* UCMB5113: una rizobacteria que mejora el crecimiento de las plantas y el manejo del estrés. *PLOS ONE*. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104651
- NTE INEN 1529-10. (1999). *Control microbiológico de los alimentos. Toma y envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico* Quito-Ecuador.
- Orozco Santos, M., García Mariscal , K., Manzo Sánchez , G., Guzmán González , S., Martínez Bolaños , L., Beltrán García , M., Canto Canché , B. (2013). *La Sigatoka Negra y su manejo integrado en Banano*. México: INIFAP.
- Parray, J., Jan, S., Kamili, A., Qadri, R., Egamberdieva, D., & Ahmad, P. (2016). Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35, 1-26. doi:10.1007/s00344-016-9583-4
- Ploetz, R. C. (2015). Fusarium Wilt of Banana. *Fitopatología* , 105(12), 1512-1521. doi:https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW
- Qiao , J. Q., Wu, H. J., Huo, R., Gao, X. W., & Boriss, R. (2014). Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1-12.  
doi:10.1186/s40538-014-0012-2
- Quevedo Guerrero, J., Infante Noblecilla, C. J., & García Batista, R. M. (2018). Efecto del uso predominante de fungi-cidas sistémicos para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella Fijiensis* Morelet) en el área foliar del banano. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(1), 128-136.

- Ramírez, M., Neuman, B. W., & Camilo A. Ramírez. (2020). Bacteriophages as promising agents for the biological control of Moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of banana. *Biological Control*, 149. doi:10.1016/j.biocontrol.2020.104238.
- Ramírez, u. C., Lozano, L. C., Méndez, M. A., Rojas, S. J., & Torres, J. N. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA*, 15(27), 45-66.
- Ramírez, Y. P. (2014). Frecuencia del despunte y dos tipos de deshoje en el manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo del plátano, estado Zulia. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 524-538.
- Reguero Reza, M. T. (2014). La secuenciación del ADN: consideraciones históricas y técnicas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 5-8.
- Reséndez, A. M., Mendoza, V. G., & Carrillo, J. L. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana Biotecnología*, XX(1), 68-83. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707
- Rodriguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166-167. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Rodriguez Cabrera, A., Quevedo Guerrero, J. N., & García Batista, R. M. (2021). Construcción de la curva de estado evolutivo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet.) en banano orgánico. *Revista Científica Agroecosistemas*, 9(2), 147-155.
- Ruiz, V. V., Gamboa, G. T., Rodríguez, E. D., Cota, F. I., Santoyo, G., & Santos-Villalobos, S. d. (2020). Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género *Bacillus*: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(2), 419-432.
- Sánchez Pila, F. E. (2016). Importancia de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* en el control biológico de enfermedades en cultivos de gran valor económico. *Bionatura*, 1(3), 135-138.
- Sánchez Valdivieso, M. S. (2021). Control de sigatoka negra en banano con fungicidas orgánicos en época de lluvia. *Revista Científica Agroecosistemas*, 108-113.
- Sánchez, G. M., Madrigal, H. C., González, S. G., & Santos, M. O. (2012). Análisis de la Sensibilidad in vitro de *Mycosphaerella fijiensis*, Agente Causal de la Sigatoka Negra del

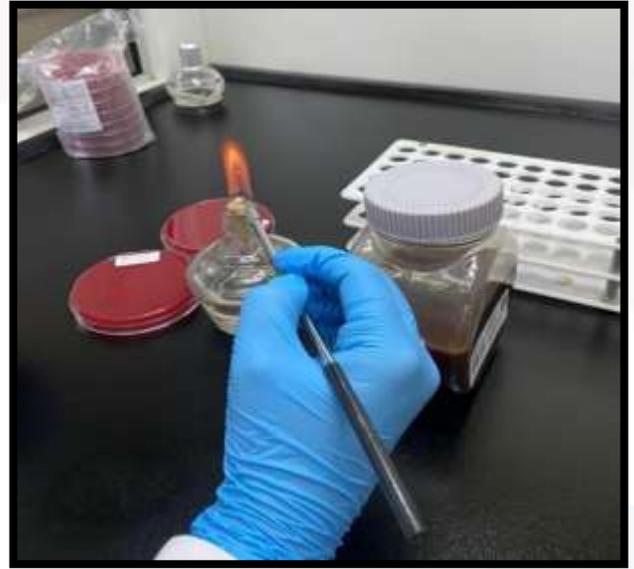
- Banano a los Fungicidas Benomyl, Propiconazol y Azoxistrobin. *Revista mexicana de fitopatología*, 30(1), 81-85.
- Saraf, M., Pandya, U., & Thakkar, A. (2014). Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological Research*, 169(1), 18-29. doi:10.1016/j.micres.2013.08.009.
- Stieglmeier, M., Klingl, A., Alves, R. J., Rittmann, S. K.-M., Melcher, M., Leisch, N., & Schleper, C. (2014). *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(2738-2752). doi:10.1099/ijs.0.063172-0
- Tejera Hernández, B., Rojas Badía, M. M., & Heydrich Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *CENIC Ciencias Biológicas*, 131-138. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
- Torres Cuy, J., De la Guardia, C., Goodridge, A., & H de Waard, J. (2013). Secuenciación de los genes 16S rRNA y rpoB para la identificación de aislados clínicos de micobacterias no tuberculosas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(1).
- Tuz Guncay, I. (2018). Manejo integrado del cultivo de banano (*Musa x paradisiaca* L.) clon williams, usando biocarbón y microorganismos eficientes. *Trabajo de titulación*. Universidad Técnica de Machala.
- Unda, S. B. (2020). Relación de la cadena de valor y de servicios ecosistémicos del banano y plátano ecuatoriano. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(3), 174-182.
- Valderrama Martín, J. M., Ortigosa, F., & Cañas, R. A. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. *Encuentros en la Biología*, 13(173), 19-25.
- Valdivia, A. L. (2022). *Inhibición del crecimiento de hongos que causan necrosis en el follaje del plátano (Musa spp. Simmonds) usando aceite y lixiviado de raquis en condiciones in vitro*. Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA).
- Vanegas, C. L., & Rodríguez, J. A. (Junio de 2018). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM*) VARIEDAD CP 722086. *Nexo*, 31, 64-73. doi:<http://dx.doi.org/10.5377/nexo.v31i01.6455>

- Velasco Jiménez , A., Castellanos Hernández , O., Acevedo Hernández , G., Aarland , R., & Rodríguez Sahagún , A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 333-345. doi:10.28940/terra.v38i2.470
- Viera Arroyo, W., Cristina Tello-Torres, A. S., Navia-Santillán, D., Medina-Rivera, L., Delgado-Parra, A., Perdomo-Quispe, C., . . . Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 2308-3867. doi:https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200128x
- Villarreal Delgado, M. F., Villa Rodríguez, E. D., Cira Chávez, L. A., Estrada Alvarado, M. I., Parra Cota, F. I., & de los Santos Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1), 95-130. doi:https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5
- Villaseñor, D., Noblecilla-Romero, Y., Luna-Romero, E., Molero-Naveda, R., Barrezueta-Unda, S., Huarquilla-Henriquez, W., Garzón-Montealegre, J. (2020). RESPUESTA ÓPTIMA ECONÓMICA DE LA FERTILIZACIÓN POTÁSICA SOBRE VARIABLES PRODUCTIVAS DEL BANANO (*Musa* spp.). *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 36(2), 161-170. doi:https://dx.doi.org/10.29393/chjaas36-14rodv80014
- Yin, X., Yang, Y., Wang, S., & Zhang, G. (2015). *Virgibacillus oceani* sp. nov. isolated from ocean sediment. *Microbiology Society* , 65. doi:10.1099/ijs.0.068213-0
- You, C., Chengsheng Zhang, F. K., Feng, C., & Wang, J. (2016). Comparison of the effects of biocontrol agent *Bacillus subtilis* and fungicide metalaxyl–mancozeb on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil. *Ecological Engineering*, 91, 119-125. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.02.011.
- Yunlong, L., Yilin, G., Juan, L., Mingzhu, X., Qing, W., & Yuanhong, W. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers in Microbiology*, 6, 883. doi:10.3389/fmicb.2015.00883
- Zeigler, D. R. (2013). The Family Paenibacillaceae. En *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains* (págs. 5-11). Columbus. doi:10.13140/RG.2.1.1949.5289
- Zhiminaicela Cabrera, J., Quevedo Guerrero, J., & Morocho Castillo , A. (2020). Deforestación y cambios en la cobertura vegetal del archipiélago de Jambelí, mediante el uso de imágenes satelitales Landsat-8. *Manglar*, 17(2), 153-157. doi:10.17268/manglar.2020.023

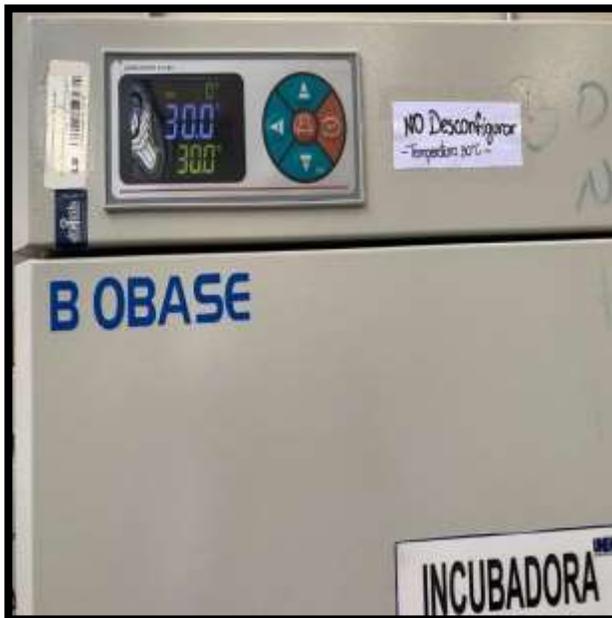
## ANEXOS



Anexo 1. Tinción de Gram de la muestra *Bacillus* spp.



Anexo 2. Siembra del biofungicida por extensión de superficie.



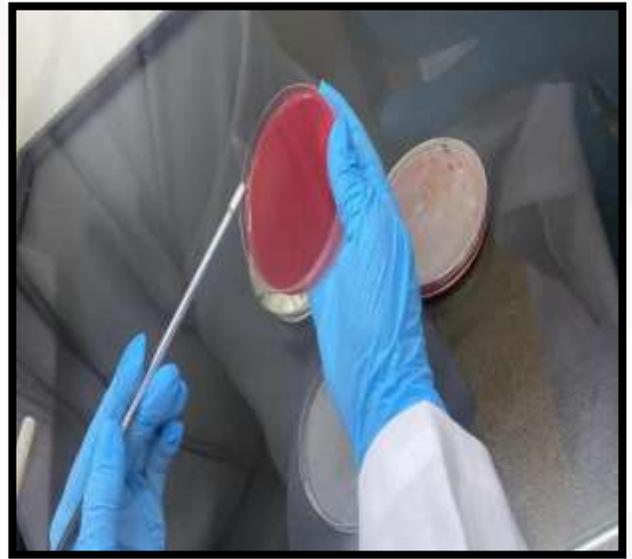
Anexo 3. Preparación de incubadora para cepas bacterianas a 30 °C.



Anexo 4. Rotulado y sellado de la siembra de la muestra madre.



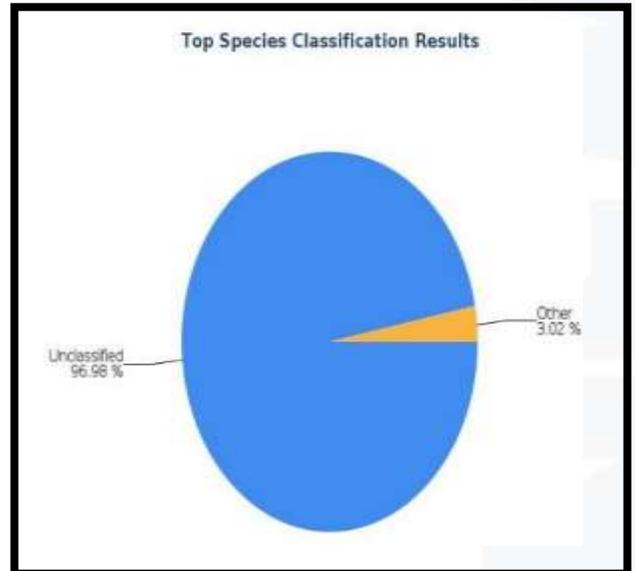
Anexo 5. Crecimiento de *Bacillus* spp. posterior a la incubación de 24 horas a 30°C.



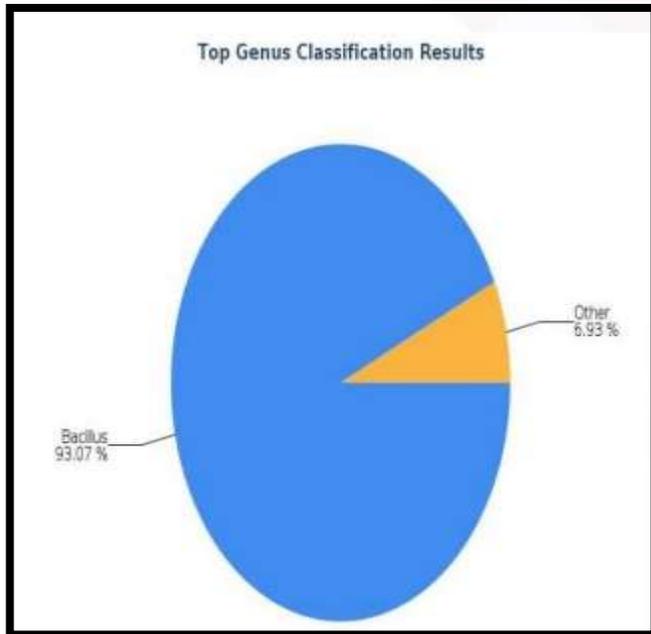
Anexo 6. Purificación de la cepa bacteriana en medio nutritivo agar BAS.



Anexo 7. Aislamiento de la cepa bacteriana en caldo LB.



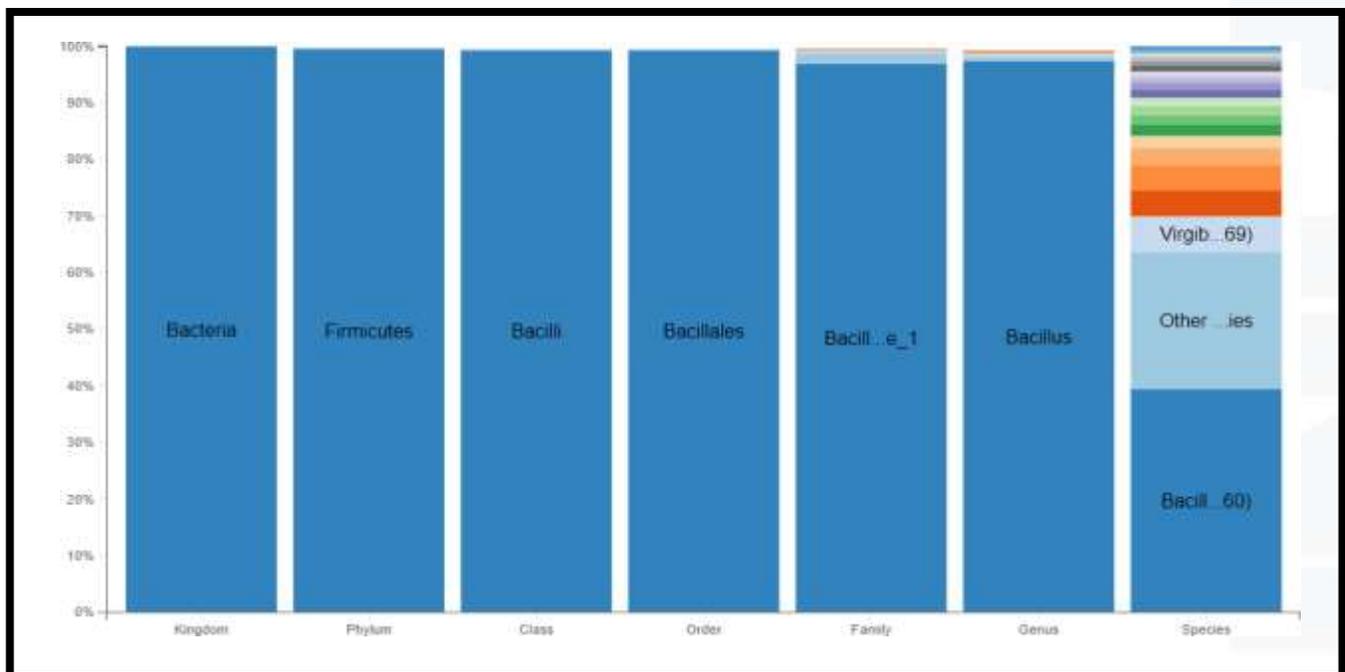
Anexo 8. Diagrama de los resultados destacados de clasificación de especies por metagenómica.



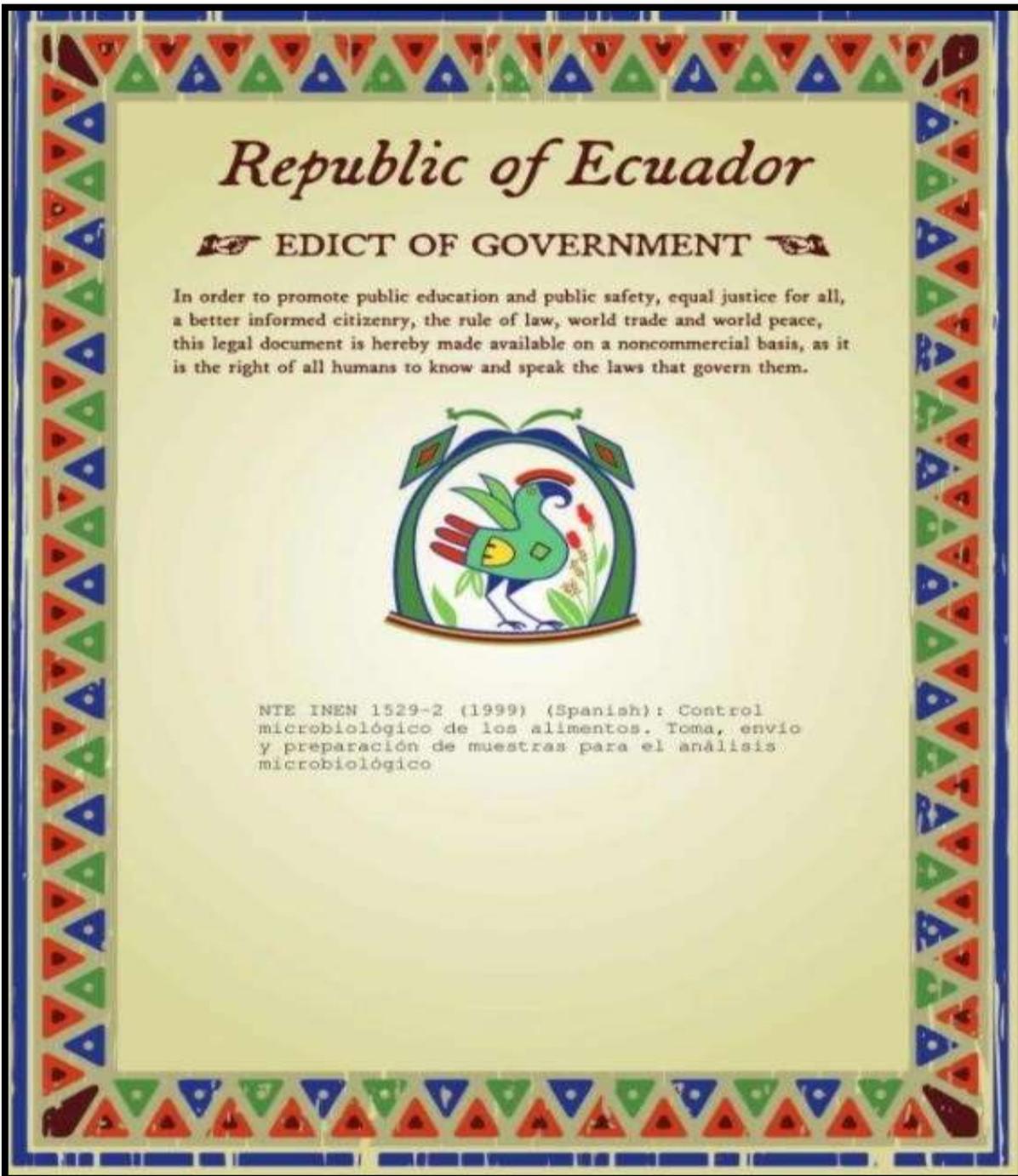
Anexo 9. Diagrama de los resultados destacados de clasificación de género por metagenómica.



Anexo 10. Revisión de los tratamientos en las parcelas experimentales.



Anexo 11. Los mejores 20 resultados de clasificación por nivel taxonómico de la secuenciación del gen 16S ARNr.



Anexo 12. Normas INEN 1529-2: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.

**UNEMI**  
UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

*¡Evolución académica!*

@UNEMIEcuador

