



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
NICARAGUA,  
MANAGUA  
UNAN-MANAGUA

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD “LUIS FELIPE MONCADA”  
RECINTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO”  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**TRABAJO MONOGRÁFICO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA**

**TEMA**

**CONTROL DE *MYCOSPHAERELLA SP* EN UN CULTIVO DE  
PLÁTANO (*MUSA SP*) POR BIOCONSORCIOS EN LA COMARCA  
"LAS VIUDAS" EN EL DEPARTAMENTO DE MANAGUA, EN EL  
PERÍODO DE JULIO A DICIEMBRE 2021.**

**Autores:**

Br. Jalmar Abel Arias Arguello  
Br. Abraham Guillermo Fariñas Marcia.  
Br. Leilani Marie Vaughan Almendárez

**TUTOR:**

Henriques José Malespín Joaquim  
Licenciado en Microbiología  
Biotechnica S.A

**ASESOR:**

MSc. Rossny Peña Almanza

Managua, Marzo 2022



*In memoriam*

*De Mario. A. Vaughan, científico, entomólogo, padre y abuelo...*

*Educadora Mireya Arguello, y*

*MSc. Wilber Delgado Rocha, por ser la diferencia, creer en*

*nuestras capacidades, confiar en nuestra investigación*

*y tendernos su más sincera ayuda.*

## **DEDICATORIA**

Dedico esta investigación a Dios por ser mi guía, más grande esperanza, dador de la sabiduría y oportunidades. A mis padres, Hellen Almendárez y Mario Vaughan, y hermanos Samuel y Stephan Vaughan por brindarme su apoyo incondicional en mi desarrollo profesional.

Leilani Marie Vaughan Almendárez.

Dedico esta investigación a mi madre, Rosa Alba Arguello, por estar presente en todos y cada uno de los momentos más importantes de mi vida, por ser madre y padre para mí, su apoyo y todo su amor, sin ella no hubiera podido recorrer este arduo camino.

A mis abuelitos Miriam y Duilio Arguello, por ser mi segundo hogar, por su apoyo, amor, y por criarme como un hijo más.

A Norman Aranda Luna, y la familia Luna, por adoptarme y brindarme ese calorcito familiar que a todo foráneo le hace falta cuando sigue sus sueños.

Al Ing. Ángel Santamaria, por su apoyo incondicional, paciencia y dedicación.

A mis amigos, Karla Martínez, Junoha Oporta, Fernanda Sánchez, Pamela Fajardo, Karla Guerra, por sus palabras de aliento, por su amistad en estos 5 duros y a la vez, bonitos años.

Y por, sobre todo, dedico esta tesis a mí mismo, por todo mi esfuerzo, por la lucha y lo difícil que ha sido llegar hasta aquí.

Jalmar Abel A. Arguello

Dedico este trabajo a Dios, a mis familiares y a mis mentores profesionales.

Abraham Guillermo Fariñas Marcia

## AGRADECIMIENTOS

A Dios padre, por brindarnos el tiempo, la sabiduría y por proveer los recursos para poder culminar esta investigación monográfica.

A la dirección del departamento de Bioanálisis clínico y al personal del laboratorio de docencia, por su disposición y apoyo a esta investigación.

A nuestro tutor Lic. Henriques Malespín, por confiar en nuestras capacidades y alentarnos a dar lo mejor de nosotros.

Al Lic. Godofredo Sobalvarro, por su contribución directa en los laboratorios de docencia, gracias por su paciencia, disponibilidad y enseñanza. Es usted una mano amiga.

Al personal de Bacteriología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR-MINSA central); Lic. Julissa Ávila, Lic. Lisette Sandoval, Lic. Carlos Solís y Lic. Miguel Peña, por su apoyo en el procesamiento y aislamiento de *Bacillus spp.*

Al Señor Daniel Riuzzhet, propietario del cultivo de plátano (*Musa spp.*), por proveer el espacio donde se efectuó esta investigación.

A Biothecnica.S.A por su colaboración y aportación de cepas, bioconsorcios y almacenamiento de las muestras que fueron necesarias para el análisis de esta investigación.

A todos nuestros amigos, por su apoyo en los momentos de tensión y sus palabras de aliento en los momentos de angustia.

A todos ellos, Gracias.

## VALORACIÓN DEL TUTOR

El presente trabajo monográfico cuya finalidad fue comprobar la efectividad microbiológica de las cepas *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* para el control tanto in vitro como in vivo de fitopatógenos que afectan los cultivos de plátano como lo es *Mycosphaerella spp* y *Fusarium spp* ofrece una visión objetiva de como la aplicación de la biotecnología puede suplir las necesidades de los productores agrícola. A su vez, representa una alternativa viable al uso excesivo de agroquímicos que se suele aplicar para el control de la sigatoka negra y otras enfermedades foliares.

Como tutor, he supervisado y guiado técnicamente a los autores **Br. Abraham Guillermo Fariñas Marcia**, **Br. Jalmar Abel Arias Arguello** y **Br. Leilani Marie Vaughan Almendárez** durante todas las etapas de elaboración de la investigación, dando, así como satisfactorio el desempeño de los mismos al realizar dicho trabajo. Agrego también mis felicitaciones a los mismos por culminar, a pesar de las limitaciones, esta monografía que servirá como piedra angular para futuras investigaciones de la misma línea.

Por lo antes expuesto doy fe que este trabajo reúne todos los criterios científicos y metodológicos para realizar la defensa monográfica.

---

Henríques J. Malespín Joaquim  
Microbiólogo

Managua, 04 de marzo de 2022

## OPINIÓN DEL ASESOR

La presente de Monografía con título: **Control de *Mycosphaerella sp* en un cultivo de plátano (*Musa sp*) por Bioconsorcios en la Comarca “las Viudas” en el departamento de Managua, en el periodo de julio a diciembre 2021.** Para presentar Defensa, elaborada por los estudiantes Br. Jalmar Abel Arias Arguello, Br. Abraham Guillermo Fariñas Marcia, Br. Leilani Marie Vaughan Almendárez. Como resultado del proceso de investigación para culminar el plan de estudio de la Carrera de Microbiología, con el fin de optar al título de Licenciados en Microbiología.

Por lo expuesto y de conformidad con lo establecido en el Capítulo III y Artículo 51 del Reglamento del Régimen Académico estudiantil de la UNAN-Managua, apruebo y respaldo la presentación pública de esta Monografía, considero que cumple con los requisitos Técnicos, Metodológicos y científicos establecidos en dicho Reglamento. Por tanto, está apto para ser defendido.

Atentamente.

---

Msc. Rossny Antonio Peña Almanza

Docente Asesor Metodológico

UNAN- Managua

## RESUMEN

A nivel mundial la utilización de microorganismos como controladores biológicos representa una disciplina que se desarrolla a un paso acelerado, provocando tremendo impacto a nivel económico y ambiental. Esta investigación nace frente a la necesidad de una alternativa eficiente para el control *Mycosphaerella sp*, agente etiológico de la sigatoka negra. La sigatoka negra es una enfermedad que reduce la capacidad fotosintética de la planta al causar daño en sus hojas, lo que trae como consecuencia la reducción en la producción del plátano

Es por ello que se planteó como objetivo determinar el control de *Mycosphaerella sp* en un cultivo de plátano (*Musa sp*) por bioconsorcios en la comarca "Las Viudas" en el departamento de Managua, en el período de Julio a diciembre de 2021. El estudio fue Descriptivo de corte transversal, y se analizaron cuatro zonas (zona testigo, zona hongos, zona bacterias y zona mixta), durante un período seis semanas, obteniéndose 240 muestras.

Fue posible demostrar mediante ensayos de antagonismo que *Trichoderma harzianum* es más competitivo (sustrato y espacio) en comparación a *Fusarium sp* y *Mycosphaerella*, pues el porcentaje de inhibición fue de 61.4 (frente a *Fusarium sp*) y 80.9% (frente a *Mycosphaerella sp*). También, se demostró que el tratamiento con mayor eficiencia fue el bioconsorcio hongos (a base de *Trichoderma harzianum*), con un 79.06 %. Por otra parte, fue posible concluir que el tratamiento más eficaz para el control de Sigatoka negra fue el bioconsorcio mixto a base de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus Subtilis* y *Bacillus Pumilus* con un porcentaje de 57.82%



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>8</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
Objetivo General .....	9
Objetivos Específicos.....	9
<b>5. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
<b>5.1 Hongos .....</b>	<b>10</b>
5.1.2 Hongos fitopatógenos de importancia económica.....	10
5.1.3 Clasificación taxonómica de los hongos .....	10
5.2 Clasificación taxonómica de <i>Mycosphaerella sp.</i> .....	10
5.3 <i>Mycosphaerella sp.</i> .....	11
5.3.1 Ciclo de vida de <i>Mycosphaerella sp.</i> .....	11
5.3.2 Factores climáticos que contribuyen a la enfermedad .....	12
5.3.3 Síntomas de la enfermedad.....	13
5.3.4 Diseminación de <i>Mycosphaerella sp.</i> .....	14
5.4. Control y tratamiento de <i>Mycosphaerella sp.</i> .....	15
5.5. Afecciones con sintomatología similar a la Sigatoka Negra .....	16
5.6. Bioconsorcios .....	17
5.6.1 Microorganismos .....	17
5.6.2 Bacterias del género <i>Bacillus</i> .....	18

5.6.3. <i>Trichoderma harzianum</i> .....	24
5.7.2 Microcultivo .....	26
5.7.3 Inoculación directa de tejido foliar: .....	26
5.7.4 Cinta adhesiva: .....	27
6. PREGUNTAS DIRECTRICES .....	28
7. DISEÑO METODOLÓGICO.....	29
8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	42
8.1 Identificación de <i>Mycosphaerella spp</i> en las parcelas de cultivo de <i>Musa</i> <i>sp</i> ubicado en la comarca “Las viudas”, departamento de Managua. ....	42
8.2 Comparación in vitro de la capacidad antagónica de bioconsorcios de hongos y bacterias sobre <i>Mycosphaerella sp</i> y <i>Fusarium sp.</i> ....	45
8.3 Valoración de la eficacia y eficiencia de bioconsorcios de hongos y bacterias mediante la aplicación in vivo de los bioinsumos. ....	53
8. CONCLUSIONES .....	63
9. RECOMENDACIONES .....	64
10. RERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
11.ANEXOS.....	67

# 1. INTRODUCCIÓN

Existen un gran número de afectaciones en la salud humana asociadas a los residuos y usos de plaguicidas, por lo tanto, la aplicación del control microbiológico se manifiesta como una alternativa eficiente y sustentable a largo plazo sobre la regulación de las plagas.

Una de las plagas que está presente en el territorio nacional es la Sigatoka negra y afecta al plátano (*Musa spp*), un rubro significativo en la economía nacional, esta plaga es provocada por el hongo *Mycosphaerella sp*, cuyo desarrollo está directamente ligado a las variaciones en las temperaturas que oscilan entre calidez, humedad y lluvias prolongadas La Sigatoka negra es la enfermedad foliar más destructora para la producción de los cultivos de plátano (*Musa acuminata Colla*), atacando principalmente el tejido foliar y evitando el proceso de fotosíntesis, provocando hasta un 50% de pérdidas en el rendimiento de la planta. (Céspedes, 2017).

*Mycosphaerella sp*, es un hongo de difícil erradicación y control, por lo tanto, el biocontrol es definido como la regulación de un organismo como consecuencia de la actividad de otro, logrando un equilibrio poblacional y provocando un efecto ralentizador sobre la plaga. En Nicaragua, la Sigatoka Negra tiene un gran impacto sobre los rendimientos e ingresos de los cultivos de plátano (*Musa spp*) de pequeños, medianos y grandes productores del país y sobre la seguridad alimentaria general.

La Sigatoka negra, se identificó por vez primera en 1963 en la costa sudeste de Viti Levu (Islas Fiji). Seguidamente se ha registrado su presencia en el conjunto del Pacífico (estrecho de Torres y península del Cabo York en Australia, Papúa Nueva Guinea, Islas Salomón, Vanuatu, Nueva Caledonia, Isla Norfolk, Estados Federados de Micronesia, Tonga, Samoa Occidental, Isla Niue, Islas Cook, Tahití y Hawái),

En América latina, la Sigatoka negra se descubrió por primera vez en Honduras en 1972. Se propagó hacia el norte (Guatemala, Belice, sur de México) y hacia el sur (El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia), convirtiéndose en la enfermedad económicamente más importante de la hoja de plátano (*musa sp*). (Mourichon, 1997)

La presente investigación titulada “**Control de *Mycosphaerella sp* en cultivos de plátano (*musa sp*) por bioconsorcios en la comarca "las viudas" de la ciudad de managua, en el período de julio a diciembre 2021**” Está orientada a la aplicación de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Trichoderma harzianum* como controladores biológicos sobre la plaga Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella sp*.

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial la utilización de microorganismos como controladores biológicos representa una disciplina que se desarrolla a un paso acelerado, provocando tremendo impacto a nivel económico y ambiental. Esta investigación nace frente a la necesidad de una alternativa eficiente para el control *Mycosphaerella sp*, agente etiológico de la sigatoka negra. La sigatoka negra es una enfermedad que reduce la capacidad fotosintética de la planta al causar daño en sus hojas, lo que trae como consecuencia la reducción en la producción del plátano

Los principales tratamientos para *Mycosphaerella sp*. son rudimentarios (deshoje) y químicos (Mancozeb, Propineb y el Clorotalonil, aminos y anilino pirimidinas), (FRAC, 2013). El uso indiscriminado de plaguicidas provoca un desequilibrio en los ecosistemas, afectando animales y seres humanos, pues, aunque en algunos de estos químicos la toxicidad sea baja, al descomponerse, como es el caso de la sal de etilenditiocarbamato usada ampliamente para proteger cultivos agrícolas de enfermedades fúngicas, al disociarse en el agua, a presencia de oxígeno, se transforma en metabolito etilentiourea, un metabolito carcinogénico y mutagénico (Domínguez, 2009).

Por las razones antes expuestas la investigación titulada: **“Control de *mycosphaerella sp* en cultivos de plátano (*musa sp*) por bioconsorcios en la comarca "las viudas" de la ciudad de managua, en el período de julio a diciembre 2021”** pretende determinar la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* sobre *Mycosphaerella*, como una alternativa para el control de Sigatoka negra.

Este tema es de gran importancia nacional, ya que promueve la utilización de microorganismos biocontroladores como una alternativa eficiente y eficaz frente a la Sigatoka Negra. De igual forma supone un beneficio para los pequeños y grandes productores, pues el costo de los bioinsumos es más reducido en comparación al tratamiento químico, y su aplicación produce metabolitos altamente nutritivos a las plantaciones. A nivel académico, este trabajo le da apertura a futuras líneas investigativas y nuevos modelos de aprendizaje más centralizadas a la biotecnología y microbiología ambiental, y contribuye al establecimiento de antecedentes para futuras investigaciones enfocadas al uso de microorganismos como biocontroladores.

## 2. ANTECEDENTES

Para el desarrollo de esta investigación se procedió a la búsqueda de información en los distintos centros de documentación y la biblioteca central de la UNAN- Managua, así como información vía internet en distintas plataformas digitales referente al tema **Control de *Mycosphaerella sp* en cultivos de plátano (*musa sp*) por bioconsorcios en la comarca "las viudas" de la ciudad de managua, en el período de julio a diciembre 2021**, en donde no existe información que aborde la utilización de microorganismos antagónicos a *Mycosphaerella sp.*, sin embargo, hay información sobre la utilización de microorganismos, en general, como control biológico, destacándose las siguientes investigaciones:

### **Nacionales:**

El trabajo realizado por Duley (2005), el cual tiene por título **“Evaluación del desarrollo de la *Sigatoka negra (Mycosphaerella sp. m)* en dos épocas (verano e invierno) en el Campus Agropecuario UNAN-León”**. En este, la investigación tenía como principal objetivo evaluar la incidencia y comportamiento de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella sp. m.*) en el período de verano e invierno en el cultivo del plátano variedad cuerno gigante (AAB). Los resultados obtenidos indican que los factores que permitieron un mayor desarrollo de la Sigatoka negra fueron las altas precipitaciones, las horas de humedad relativa mayor al 90% y las temperaturas bajas menores de los 25°C. En los meses de verano (enero– abril) con humedad relativa de 40% a 70% la severidad de la enfermedad fue relativamente baja, en relación con la severidad y comportamiento que esta presentó en el invierno.

Méndez, J. (2018) en su investigación titulada **“Desarrollo a nivel de laboratorio de un bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis*, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de Interés agrícola”** en el cual se tuvo como objetivo general: “Desarrollar un bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* aislado y caracterizado microbiológica y molecularmente a partir de bioinsumos artesanales para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola”, entre los objetivos específicos, solo por mencionar, estaban: “Caracterizar los microorganismos por tipos: bacterias, hongos filamentosos y levaduriformes que estén presentes en las matrices de bioinsumos, a través de observación de características morfológicas en microscopio; Realizar la

formulación de un bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis*, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola, considerando la realización de ensayos de patogenicidad in vitro y en invernadero”. En esta investigación se llevó a cabo el aislamiento e identificación de bacterias a partir de bioinsumos producidos artesanalmente en Nicaragua, evaluando in vitro y en condiciones de invernadero su antagonismo frente a hongos fitopatógenos de interés agrícola. Se evaluó el potencial antagónico mediante confrontación dual frente a los hongos identificados como *Fusarium equiseti*, *Fusarium sp.* y *Alternaria alternata*, y se determinó la capacidad de antagonismo de *Bacillus subtilis* contra hongos fitopatógenos en el cultivo de papa.

De acuerdo con Arauz, M. (2020) en su estudio **“Alternativas biológicas y químicas para el manejo de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella sp. Morelet*) del plátano (*Musa paradisiaca L.*) cv. Curaré Enano en Tonalá, Chinandega 2019”** el cual tuvo por objetivo general “Generar información sobre el uso de alternativas biológicas y químicas para el manejo de la sigatoka negra (*Mycosphaerella sp. Morelet*) del plátano (*Musa paradisiaca L.*). Sus objetivos específicos fueron: Determinar el efecto de alternativas biológicas y químicas sobre variables agronómicas y su relación con la incidencia de sigatoka negra del cultivo del plátano; Estimar incidencia y severidad de sigatoka negra bajo condiciones de campo usando alternativas biológicas y químicas. El mayor promedio de hojas por planta se obtuvo en los tratamientos a base de *Trichoderma sp.* La posición de la hoja más joven enferma para los tratamientos estuvo en la posición cinco. El mayor porcentaje de hojas sanas y el menor porcentaje de incidencia se obtuvo en el tratamiento químico. El promedio ponderando de infección fue igual para todos los tratamientos. Las conclusiones de este trabajo fueron que los tratamientos a base de *Trichoderma sp* obtuvieron el mayor promedio de hojas sanas por planta. El tratamiento químico logró el mayor porcentaje de hojas sanas, la menor incidencia de sigatoka y la hoja más joven enferma en la posición cinco; Todos los tratamientos obtuvieron el mismo promedio ponderado de infección.

#### **Internacionales:**

**“Manejo de sustratos para el control biológico de Sigatoka negra (*Micosphaerella fijensis Morelet*) en el cultivo de banano (*Musa AAA*)”** elaborado por Arango (2000), el objetivo general de este trabajo fue evaluar alternativas potenciales de control biológico para el manejo de Sigatoka negra en un cultivo de banano, mediante la aplicación de sustratos dentro de una estrategia de

manejo integrado de plagas”, entre sus objetivos específicos tuvo el “estimar el incremento de la población bacteriana en la filosfera tanto a nivel de invernadero como de campo, mediante la aplicación de sustratos; Evaluar el efecto del lavado de la hoja sobre la dinámica poblacional de los microorganismos de la filosfera; Evaluar el efecto de la aplicación de diferentes sustratos sobre el desarrollo de la sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis*.

También está el trabajo titulado **“Evaluación de dos fungicidas protectores y seis fungicidas sistémicos para el combate de la sigatoka negra (*Mycosphaerella sp. var difformis*) en una plantación de plátano currare (musa aab) en la zona de san Carlos”** elaborado por Bolaños, A., (2006), el cual tiene como objetivo general la elaboración de un programa de manejo químico de combate de la Sigatoka Negra en el cultivo de plátano en la Zona de San Carlos y como objetivos específicos probar diferentes químicos para el combate de la Sigatoka Negra; Definir un programa de manejo o combate químico eficiente y económico para el productor de plátano en la Zona de San Carlos; Definir un programa de muestreo semanal utilizando la escala STOVER de seis grados, para cuantificar la incidencia y severidad de la enfermedad en la plantación. Entre los resultados obtenidos se cita que la deshoja bisemanal afecta la efectividad de los fungicidas, al permitir una acumulación excesiva de la fuente de inóculo en la plantación y producir niveles de severidad muy altos de la enfermedad. También se comprobó que los tratamientos con fungicidas sistémicos en emulsión con aceite agrícola y mezclados con un fungicida protectante, tienen un mejor control de la enfermedad y una mejor respuesta ante niveles altos de severidad que con los tratamientos con fungicidas protectantes. En cuanto a los fungicidas sistémicos fue el Tridemorf el que mejor resultados obtuvo al final del periodo experimental, aunque los otros fungicidas sistémicos también mostraron resultados aceptables. Respecto a las variables evaluadas se concluyó que la hoja más joven enferma (HMJE) y hojas totales a floración (HT) son el mejor punto de referencia para un programa de control químico desde el punto de vista técnico y que el PPI pueden utilizarse como herramienta de medición y control de la severidad y la calidad de deshoja en la plantación respectivamente. También se comprobó la importancia del programa de muestreo semanal, el cual permitió observar el comportamiento de la enfermedad en el transcurso del tiempo ante la acción de los fungicidas y de esta forma tener criterio técnico para determinar el programa de control químico a seguir. Este trabajo logro concluir que un manejo integrado de Sigatoka Negra que combine una deshoja adecuada y la aplicación de fungicidas de forma cíclica, es la herramienta básica para el control de esta enfermedad en plátano y que los tratamientos con



fungicidas protectantes se ven más afectados que los tratamientos con fungicidas sistémicos ante niveles de severidad altos, así como los tratamientos con fungicidas sistémicos y mezclados (cócteles) tienen mejor control de la enfermedad en época de alta precipitación.

El trabajo titulado “**Fungicidas orgánicos para el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella finjensis*), en el cultivo de banano (Musa AAA) Valencia-Los Ríos**” elaborado por Caicedo, E (2015), la cual tenía como objetivo general evaluar el efecto de los fungicidas orgánicos Sonata, Serenade, Max-Fun, para el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella finjensis*) en el cultivo de banano (*Mussa AAA*). Los objetivos específicos fueron evaluar el porcentaje de residualidad que causan los fungicidas orgánicos protectantes mediante el tiempo en el cultivo de banano; determinar la eficacia de los fungicidas orgánicos Sonata, Serenade, Max-Fun, mediante la infestación de la Sigatoka Negra en el cultivo; establecer el efecto de los fungicidas en el ritmo de emisión foliar. Este trabajo concluyó que el fungicida Sonata a 2 L ha<sup>-1</sup> reportó un mejor comportamiento en control y residualidad en comparación con el testigo absoluto y los demás fungicidas hasta los 49 días después de la aplicación, además de poseer un efecto de inducir los mecanismos de defensa en las plantas, superó a los demás tratamientos controlando la enfermedad en un 32,13 % a los 49 días.

El trabajo elaborado por Martín et al. (2018) ‘*Efecto de Bacillus pumilus CCIBP-C5 sobre la interacción Musa-Pseudocercospora fijiensis*’. el objetivo fue determinar el efecto de la actividad antifúngica del filtrado de cultivo (CF) de la cepa CCIBP-C5 de *Bacillus pumilus*, un aislado de una filósfera de hojas de banano (*Musa*), en plantas de banano expuestas a *Pseudocercospora fijiensis*. Se demostró que el CF disminuye la biomasa fúngica e induce cambios en la planta de banano. En este sentido, a los 70 días post inoculación (dpi), se obtuvo un menor índice de infección, así como una disminución de la biomasa fúngica a los 6 dpi en las plantas tratadas con respecto al control. Al mismo tiempo, se observaron cambios en las actividades de varias enzimas relacionadas con las respuestas de defensa de las plantas, como la fenilalanina amoniaco liasa, las quitinasas, las  $\beta$ -1,3-glucanasas y las peroxidasa. Estos resultados indican que *B. pumilus* CCIBP-C5 tiene un papel potencial para el control biológico de *P. fijiensis* posiblemente debido a la producción de metabolitos antifúngicos.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Mycosphaerella sp.* es el agente causal de la principal enfermedad fúngica del plátano (*Musa spp*), llamada Sigatoka negra. la cual fue descubierta en Nicaragua en el año de 1979. Es una enfermedad foliar que afecta gradualmente la capacidad fotosintética del cultivo reduciendo los rendimientos de estos. Los principales efectos de este hongo patógeno son: primeramente, la reducción de más de la mitad del peso del racimo cuando no se controla, causando además una maduración prematura del fruto; siendo estas las principales causas de las pérdidas económicas ocasionadas por la enfermedad.

En Nicaragua el cultivo de plátano tiene una explotación agropecuaria (EA) de 77 251.33 MZ, es decir 54 415.836 852 hectáreas (CENAGRO -2011), por lo que se considera un rubro rentable desde el ámbito económico y de seguridad alimentaria. Cuando este cultivo se ve afectado por la Sigatoka Negra, cuyo agente etiológico es *Mycosphaerella sp* se hace imprescindible la utilización de tratamientos que contribuyan al control del hongo, en la mayoría de los casos, el tratamiento se basa en la aplicación de productos químicos, lo que representa un porcentaje de costos considerables, daños al medio ambiente y a la salud humana. Teniendo presente lo antes expuesto, surge la idea del estudio de bioconsorcios para el biocontrol de *Mycosphaerella*, como una alternativa eficiente, rentable y sostenible.

De aquí parte la siguiente interrogante: **¿Cuál es la eficacia y eficiencia de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Trichoderma harzianum* (bioconsorcios) para el tratamiento de Sigatoka negra por *Mycosphaerella spp* en *Musa sp*?**

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar el control de *Mycosphaerella sp* en un cultivo de plátano (*Musa sp*) por bioconsorcios en la comarca "Las Viudas" en el departamento de Managua, en el período de Julio a diciembre de 2021.

### Objetivos Específicos

1. Identificar *Mycosphaerella sp* en las parcelas de cultivo de *Musa sp* ubicado en la comarca “Las viudas”, departamento de Managua.
2. Evaluar in vitro la capacidad antagónica de bioconsorcios sobre *Mycosphaerella sp* aislada en cultivo de *Musa sp*, mediante ensayos de antagonismo.
3. Valorar la eficacia y eficiencia de los bioconsorcios de hongos y bacterias mediante la aplicación in vivo de bioinsumos en cultivos de plátano (*Musa sp*) infectados con *Mycosphaerella spp*.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Hongos

Los hongos son organismos eucariotas que poseen un núcleo verdadero (perfectamente formado), caracterizados por poseer una pared celular de quitina, a diferencia de la celulosa, componente principal de la pared celular de la célula vegetal, Según Ryan y Ray (2019) “son eucariotas con un nivel de complejidad biológica superior al de las bacterias. Portan esporas y tienen reproducción tanto sexual como asexual. Los hongos pueden ser unicelulares, o se pueden diferenciar y hacer multicelulares” (p. 527).

#### 5.1.2 Hongos fitopatógenos de importancia económica

Los diferentes cultivos que nos permiten obtener alimentos para consumo humano aparte de las adversidades climáticas y de nutrientes del suelo, sufren de diferentes plagas en el momento de su desarrollo, ya que estos suelen ser objeto de muchos microorganismos patógenos, desde bacterias, como algunas especies de *Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Erwinia sp.*, entre otras, así como parásitos nematodos que van desde los *Meloidogyne sp.* hasta los *Ditylenchus sp.* Por otro lado, también tenemos los hongos fitopatógenos, los cuales son muy nocivos puesto que sus estructuras reproductivas poseen una gran resistencia a los factores ambientales, aún mayores que los que poseen nematodos y bacterias, aparte que tienen una mayor posibilidad de distribución, puesto que las esporas son fácilmente arrastradas por vientos y aguas.

#### 5.1.3 Clasificación taxonómica de los hongos

En la actualidad el Reino fungi esta agrupado en dos divisiones, Ascomycota y Basidiomycota, la división Ascomycota incluye todos los hongos de micelio tabicado que producen ascosporas endógenas, las subdivisiones, clases órdenes y demás se muestran a continuación:

### 5.2 Clasificación taxonómica de *Mycosphaerella sp.*

- Reyno: Fungí
- División: Ascomycota (Hongos formadores de esporas en ascas “ascosporas endógenas” y con micelio tabicado)
- Subdivisión: Pezizomycotina (Formadores de ascoma y se reproducen por fisión)
- Clase: Pezizomycetes

- Orden: Dothideales (ausencia de hamathecium en un lóculo, y la formación de ovoide a cilíndrica fistunicadas)
- Familia: Dothideaceae
- Género: *Mycosphaerella*
- Especie: spp

### **5.3 *Mycosphaerella sp.***

*Mycosphaerella sp* es el agente etiológico de la sigatoka negra, enfermedad descrita por primera vez en la isla de Fiji en 1963 (Vicente, 2002) Sin embargo, la enfermedad estaba ampliamente difundida en el pacífico antes de su descubrimiento en la isla Fiji. (Rivas & Rosales, 2003). *Mycosphaerella sp.* es un hongo que se produce en forma sexual y asexual durante su ciclo de vida, pues posee un ciclo de vida heterotálico” (Arauz, 2020). Se desarrolla en el envés de las hojas del plátano desde el primer estado de la estría hasta el secamiento de la lesión.

Según Benavides, (2019), *Mycosphaerella sp.* “presenta células sexuales llamadas ascosporas, producidas en los pseudotecios cuando ocurre la fertilización de las ascas por las espermacias” (p. 9). También presenta espermogonios y ascósporas indiferenciables morfológicamente a otras especies de *Mycosphaerella sp.*, pero que, a pesar de esto, se diferencia de otras especies en la cantidad de distribución del mismo, pues Sigatoka negra “presenta una mayor cantidad de pseudotecios y espermogonios en las machas maduras” (Viljoen, 2017, p.78)

El diámetro de los pseudotecios Según Pérez, V., (2018) “es variable, de 43 y 86,5  $\mu\text{m}$  (promedio 56  $\mu\text{m}$ ), con ascas bitunicadas hialinas sin paráfisis, con dos hileras de ascósporas bicelulares con una célula anterior mayor y una constricción marcada a nivel del septo, de 12-18,4 x 2,5-5  $\mu\text{m}$  (p. 43)”.

#### **5.3.1 Ciclo de vida de *Mycosphaerella sp.***

Soza (2020) nos dice que:

*Mycosphaerella sp.* es un hongo ascomiceto que tiene los dos tipos de reproducción, asexual y sexual. El primer tipo de reproducción genera esporas (estructuras infectivas) llamadas conidios, mientras que en la segunda se producen las ascosporas. En la reproducción asexual, las hifas forman una estructura donde se desarrollan los conidióforos

y de cada conidióforo pueden formarse cuatro estructuras infectivas llamadas conidios. Por otra parte, la reproducción sexual se caracteriza por la formación de las siguientes estructuras: espermagonios, peritecios y ascosporas. Los espermagonios son la parte masculina del hongo y generalmente se encuentran en el envés de las hojas del banano, mismos que producen los gametos masculinos conocidos como espermatia, y estos a la vez sirven para fertilizar los cuerpos fructíferos del ascomiceto (pseudotecios). La parte femenina del hongo se conoce con el nombre de pseudotecios o peritecios y estas estructuras contienen una especie de sacos llamados ascas, donde se generan las ascosporas; cada asca contiene ocho ascosporas, que son las estructuras infectivas generadas de la fase sexual. (p.34)

### **5.3.2 Factores climáticos que contribuyen a la enfermedad**

*Mycosphaerella sp.* es un fitopatógeno que ha presentado diferentes factores que la vuelven uno de los principales problemas en los cultivos de plátanos, uno de estos es su variabilidad genética que le permite desarrollar resistencia al entorno, y a los factores climáticos que le afectan. Según Orozco, H., (1998), “la recombinación debido a la naturaleza heterotálica de este patógeno, crea un alto potencial para que ocurran cambios genéticos dentro de las poblaciones de *Mycosphaerella sp.*” (p. 3), esto puede conducir a una rápida adaptación a las condiciones ambientales cambiantes y es la razón de la elevada variabilidad patogénica de *Mycosphaerella sp.*

La epidemiología de la Sigatoka negra depende principalmente de factores climáticos. Los patrones de temperatura y humedad (básicamente el número de horas que la superficie de la hoja permanezca humedecida) y la disponibilidad de evolución de la enfermedad (Pérez, 2017). Los principales factores climáticos de los cuales esta depende son: humedad, temperatura, precipitaciones y la capacidad del fitopatógeno de desarrollarse en el lugar, dichos factores, según Fouré (1994) “Condicionan una mayor incidencia y severidad de la enfermedad” (p. 98).

La humedad provoca una mayor liberación de estructuras reproductivas del hongo al ambiente, prueba de ello es lo descrito por Gómez, (2017) el cual dice que “es común la liberación de estructuras fúngicas bajo condiciones de lluvias y viento” (p. 21)

Al relacionar una temperatura de entre los 20 a 35 °C obtenemos un mejor desarrollo del microorganismo, ya que se crean las condiciones necesarias que este necesita para un crecimiento

más óptimo, de esta forma se contribuye de forma directa al fortalecimiento de epidemias regionales en diferentes plataneras. Pérez, (2017) estimó que “las ascosporas de *Mycosphaerella sp.* germinan en un rango amplio entre 10-38 °C, considerándose óptimo 27 °C, observándose que la velocidad relativa del crecimiento de los tubos germinativos de esta se deprime fuertemente a temperaturas menores de 20 °C” (p. 8).

Con respecto al viento, se ha observado que la concentración de las conidióforas en las plantaciones es alta en las capas inferiores del aire, en comparación con el follaje, mientras que las ascosporas en el aire es la misma en ambas alturas, lo cual indica su importancia en el ciclo de la enfermedad. Las esporas de la Sigatoka negra son dispersadas por el viento y depositadas en las hojas más jóvenes de la planta (Gómez, 2017)). Las esporas depositadas germinan, si las condiciones de humedad son buenas, emitiendo un tubo germinativo que penetra por las estomas de las hojas, para luego ramificarse y colonizar varias células vecinas, produciendo el síntoma característico de pizca y posteriormente la mancha necrosis.

### **5.3.3 Síntomas de la enfermedad**

El problema al diagnosticar sintomatológicamente a sigatoka negra es la similitud que los síntomas de esta poseen con respecto a otras enfermedades del plátano, uno de los principales síntomas es la aparición de manchas cloróticas que evolucionan a necrosis, disminuyendo así la capacidad fotosintética de las plantas, lo cual resulta en una menor productividad de las mismas.

Las esporas del hongo *Mycosphaerella sp.*, al germinar sobre la superficie inferior de las hojas y penetrar sus hifas a través de las estomas, inician un proceso rápido de colonización del mesófilo foliar, apareciendo el primer síntoma en forma de estría pequeña (pizca) de un color marrón oscuro de 1 a 2 mm de largo, que aumenta de tamaño, formando lesiones necróticas con halos amarillos y centros gris claro (Liberato, 2021).

La evolución de esta enfermedad en la hoja se puede ver a través de sus 6 estadios según Bennet (2005):

- Estadio 1: Se presenta una pequeña decoloración que solo se observa en el envés de la hoja. Es una pizca de color café rojizo.
- Estadio 2: La pizca crece hasta formar una raya o pequeña estría de color café rojizo visible tanto en el haz, como en el envés.

- Estadio 3: La estría aumenta grosor y longitud, manteniendo su color café rojizo y bajo condiciones propicias puede aumentar de tamaño hasta 3 cm.
- Estadio 4: Este síntoma es una mancha circular elíptica, hay un ligero cambio de color de café rojizo a un café más oscuro.
- Estadio 5: Las manchas descritas anteriormente son rodeadas por un halo amarillo (clorótico).
- Estadio 6: la mancha sufre nuevamente un cambio de color, la lesión inicia a deprimirse, y en las zonas más claras se observan los peritecios (puntos negros) (p. 3).

#### **5.3.4 Diseminación de *Mycosphaerella* sp.**

Este hongo se disemina por medio de sus estructuras sexuales y asexuales (ascosporas y conidios), sin embargo, la reproducción sexual es la más importante para el desarrollo y diseminación de la enfermedad.

Es un hongo que se disemina fácilmente debido a sus estructuras reproductivas, las cuales le confieren al mismo la capacidad de resistencia a factores ambientales-climáticos, principalmente se disemina por factores climáticos, como lo es el arrastre del fitopatógeno por corrientes de viento, agua, etc. De aquí nacen dos formas principales de diseminación, los cuales se relacionan directamente a la distancia en que se producen las nuevas infecciones; la dispersión horizontal y la dispersión vertical o secundaria.

La dispersión horizontal se da cuando las ascosporas maduras son dispersadas por medio del viento a larga distancia por medio del viento a larga distancia y a unos 3° cm de altura, esto aumenta en los periodos de lluvia y alta humedad.

Por otra parte, la dispersión vertical se lleva a cabo por el viento, alta humedad y agua por medio del salpique, lo que disemina los conidios del hongo, al estar cerca las plantas una de la otra hay una mayor humedad, lo cual aumenta la probabilidad que la enfermedad se propague. La tercera dispersión la realiza el hombre por medio de las prácticas agrícolas (Carcache, 2005).



#### **5.4. Control y tratamiento de *Mycosphaerella* sp.**

Según Menjivar, J., y Piraneque, N., (2020) “Hasta la fecha no existe un manejo exacto que logre curar la enfermedad causada por este hongo” (p. 10), esto debido a la agresividad del patógeno y a su característica policíclica, lo que nos deja pocas opciones para poder darle un tratamiento a la enfermedad, en la mayoría de los casos lo que se realiza es un deshoje periódico entre dos semanas más o menos, pero al realizar el deshoje se debe de garantizar que la planta llegue a la cosecha con al menos 9 hojas.

Menjivar, J., y Piraneque, N., (2020) nos dicen que “el manejo de la Sigatoka negra en plantaciones comerciales de bananos en el mundo es altamente dependiente del uso de fungicidas, los cuales son apoyados con prácticas de cultivos (deshoje, deshije, drenaje, control de maleza y nutrición)” (p. 11) esto para reducir fuentes de inóculos y evitar condiciones favorables para el desarrollo del patógeno.

El control químico y la selección de plantas resistentes continúan siendo las únicas estrategias, por excelencia, para combatir la sigatoka negra. Para los pequeños agricultores, los clones resistentes o tolerantes serían las medidas de control mejor adaptadas a su formación técnica y al contexto socio económico de este cultivo.

Sin embargo, “hoy en día el combate químico es la alternativa más usada para hacerle frente. Esta opción trae problemas colaterales, como es el caso de contaminación ambiental, salud humana y resistencia del hongo causal a los fungicidas” (Arauz, 2020).

A escala mundial el control químico de la sigatoka negra, se considera de alto riesgo por los problemas de resistencia del hongo a algunos grupos de fungicidas. Existen numerosos reportes sobre las pérdidas de sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas benzimidazoles y más recientemente a los triazoles. Según Escudero y Rendón (1996) “en la actualidad, se ha intensificado el uso de fungicidas protectantes en todas las áreas productoras” (p. 23) esto si se realizan aplicaciones periódicas cada siete a 12 días. “Con la implementación de los programas de protectantes basado en fungicidas mancozeb, se requieren aplicaciones semanales durante la época de lluvia y cada 10-14 días durante la época de seca, que anualmente serían 30-35 aplicaciones” (Arauz, 2020).

La evaluación de nuevas moléculas de fungicidas sin o pocos efectos nocivos al ambiente y salud humana son prioritarios para la búsqueda de nuevas alternativas de manejo de Sigatoka negra, dentro de este grupo de fungicidas se encuentra el azoxistrobin mencionado anteriormente, que es seguro desde el punto de vista ambiental (Arauz, 2020).

### **5.5. Afecciones con sintomatología similar a la Sigatoka Negra**

El hongo *Fusarium oxysporum* causa el marchitamiento, al cual en la industria bananera se refiere comúnmente como el Mal de Panamá. Por lo general, esta enfermedad es considerada como una de las enfermedades más destructivas en ciertas regiones bananeras del mundo. La enfermedad del Falso Mal de Panamá, que puede ser confundida fácilmente con el marchitamiento por *Fusarium*, por primera vez fue descrita por Deacon en 1985.

Los síntomas externos de la enfermedad del Falso Mal de Panamá pueden ser confundidos fácilmente con los del marchitamiento por *Fusarium*. En la mayoría de los casos, el amarillamiento empieza en las hojas más bajas o viejas. El margen de cada hoja se torna verde pálido a amarillo, aparecen rayas necróticas rodeadas por un margen amarillo y la hoja muere finalmente.

Las hojas inferiores mueren y se cuelgan del pseudotallo como una falda. Algunas veces la base de la hoja permanece verde y saludable, mientras que su parte distal se muere. A menudo, de 1 a 4 hojas de la parte superior permanecen verdes, pero son pequeñas y su desarrollo se estanca. “Puede ocurrir un crecimiento de hojas nuevas pero los racimos en este caso por lo general son pequeños con dedos cortos y delgados. A menudo se presentan características parecidas a las de la *strelitzia* y de crecimiento pasmado, relacionadas con el estrés” (Cassey, 2016).

Según Cassey, B., (2016) “en el caso del marchitamiento por *Fusarium*, las hojas muestran el amarillamiento uniforme y pronunciado en los márgenes de las hojas, a lo largo de toda la hoja. Posteriormente, el amarillamiento procede hacia dentro hasta la vena central y los márgenes se tornan de color marrón y luego gris” (p. 3).

Esta enfermedad provoca también síntomas internos en la planta, según Hernandez, J., (2001):

“Cuando el pseudotallo de una planta que muestra los síntomas de la enfermedad del Falso Mal de Panamá se corta transversalmente, aproximadamente a unos 50 cm por encima del nivel del suelo, a menudo se ven filamentos vasculares descolorados de color rojo vino. En la planta afectada por

el marchitamiento por *Fusarium* siempre se presentan áreas manchadas cuyo color cambia de marrón a gris, llamadas bolsillos gomosos. El pseudotallo, a la altura de 50-100 cm por encima del nivel del suelo contiene muchos filamentos vasculares rojo vino descolorados, tanto en las plantas afectadas por el Falso Mal de Panamá, como en las plantas afectadas por el marchitamiento por *Fusarium*. En las plantas afectadas por el marchitamiento por *Fusarium*, la decoloración es más o menos continua y puede ser trazada hacia la parte inferior del pseudotallo. En el caso del Falso Mal de Panamá, los filamentos vasculares descolorados usualmente no son continuos, ocurriendo en regiones cortas de unos 10 cm de largo separados por unas brechas anchas. Cuando se parte el rizoma en una planta con el Falso Mal de Panamá, se ven manchas marrones y filamentos blancos, mientras que las plantas infectadas con el marchitamiento por *Fusarium* muestran manchas y filamentos de color amarillo” (p. 3)

## **5.6. Bioconsorcios**

Los bioconsorcios se pueden utilizar en la producción agrícola ya que no dejan residuos tóxicos en el ambiente, no implicando riesgos para la salud de los agricultores y consumidores ya que son obtenidos de plantas naturales, referente a esto Whelan, (2013) refiere “Los bioconsorcios son bioinsumos que aluden a los productos elaborados a partir de organismos benéficos tales como bacterias, hongos, virus, e insectos, o bien a extractos naturales obtenidos de plantas, y que pueden ser utilizados en la producción agrícola para controlar plagas, o promover el desarrollo de las plantas. Son productos que no dejan residuos tóxicos en el medio ambiente y cuya utilización no implica riesgos para la salud de los agricultores y de los consumidores.” (p. 50) .

En la actualidad, la adopción de bioinsumos en la agricultura cobra una importancia primordial en términos de sustentabilidad y productividad.

### **5.6.1 Microorganismos**

Tradicionalmente, el manejo de fitopatógenos se realiza mediante el uso de agroquímicos con efectos biocidas (antibacterianos, antifúngicos, antivirales, anti-oomycetos, nematocidas). Sin embargo, su aplicación constante ha conducido a eventos de desarrollo de resistencia particularmente en el caso de bacterias y hongos. Este escenario a su vez ha desencadenado el uso de mayores dosis de los químicos disponibles o la entrada al mercado de nuevas moléculas con espectros de acción más amplios. “El uso de una mayor cantidad de agroquímicos (en

concentración, dosis o diversidad) ha provocado efectos deletéreos para el medio ambiente por contaminación de suelos y fuentes hídricas, para la salud humana por exposición directa y prolongada a los agroquímicos y para la biodiversidad de microorganismos e insectos benéficos para el cultivo, que son susceptibles a las moléculas que conforman el producto biocida y cuyas poblaciones se reducen como efecto secundario tras la aplicación del químico” (Vinchira, y Villagra, 2019, p. 8).

### **5.6.2 Bacterias del género *Bacillus***

Según (Shoda, 2019) los estudios relacionados a el uso de especies gram-positivas del género *Bacillus spp.* como biocontrolador es baja en comparación con los estudios y reflectores que las bacterias gram negativas han recibido a lo largo. *Bacillus spp.* posee características de omnipresencia en aceites, rápido crecimiento en cultivos líquidos y formación de esporas resistentes lo que permite considerar al género un agente controlador de nivel alto.

El género *Bacillus sp.* Según Calvo, P., y Zuñiga, D., (2010), “Son bacterias Gram positivas tienen la ventaja de poseer diversos mecanismos para asegurar su sobrevivencia ante condiciones físicas desfavorables, bajo estas condiciones *Bacillus spp.* inicia una serie de respuestas; si estas respuestas fallan para poder mantenerse en estado vegetativo se induce la esporulación” (p. 39). La habilidad de las especies de *Bacillus* de formar endosporas altamente resistentes les da una ventaja competitiva muy importante en un ambiente como el suelo. Así mismo, “*Bacillus spp.* también se deben adaptar a cambios bruscos de temperatura, para esto cuentan con genes de shock térmico inducibles que incluyen proteínas chaperonas y proteasas” (Peterson, A., eteal, 2001, p. 10).

Estudios bioinformáticos a partir de la secuencia del genoma de diferentes cepas de *Bacillus* han permitido predecir la presencia de genes asociados con la producción de compuestos antimicrobianos, dando así un potencial mecanismo de acción de estos biocontroladores.

Estas bacterias pueden producir sustancias antimicrobianas de distinta naturaleza, que pueden ser divididas en los siguientes tipos: un grupo de péptidos de síntesis ribosomal, policétidos (PK) y pequeñas moléculas peptídicas de síntesis no ribosomal (NRPs por sus siglas en inglés). Los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se caracterizan por poseer una longitud entre 12 y 50 aminoácidos, generando moléculas que son

de carácter catiónico principalmente. Tienen gran diversidad estructural y son comúnmente conocidos como bacteriocinas, que pueden clasificarse de acuerdo con su estructura química, estabilidad térmica, sensibilidad enzimática presencia de aminoácidos modificados y con su modo de acción.

La clasificación propuesta por Mary, C., et al. (2016) divide las bacteriocinas en tres clases:

“Clase I, péptidos modificados incluyendo lantibióticos y lantipéptidos (clase Ia), labirintopeptinas (clase Ib), caracterizadas por la presencia de labionina que es un amino ácido carbáclico modificado postraduccionalmente, y sactibióticos (clase Ic), que son péptidos cíclicos pequeños altamente modificados postraduccionalmente.

Clase II, que incluye péptidos no modificados menores a 10kDa, subdivididos en cuatro subclases: péptidos relacionados con pediocina (clase IIa), bacteriocinas de dos péptidos (IIb), bacteriocinas circulares (IIc) y bacteriocinas de un péptido lineal y no relacionadas con pediocina (IId).

Clase III (bacteriolisinas), un grupo de proteínas termolábiles con propiedades antibióticas que debido a su tamaño (> 30KDa), dichos autores no las consideran bacteriocinas propiamente dichas. De manera general, merece resaltar que las bacteriocinas están involucradas en la defensa contra bacterias estrechamente relacionadas con las bacterias que las producen” (p. 5)

Los péptidos de síntesis no ribosomal se caracterizan por contener aminoácidos. A nivel estructural son macrociclos ya sea ramificados o dímeros y trímeros de elementos estructurales idénticos. Adicionalmente, son sintetizados por complejos enzimáticos definidos como enzimas modulares multidominio, denominadas sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs), donde cada módulo incorpora un aminoácido al esqueleto peptídico. De esta manera, cada módulo consta de tres dominios: Dominio de adenilación (A) formado por 550 residuos de aminoácidos, dominio portador de péptido (PCP) o tiolación (T) de 80 aminoácidos y dominio de formación del enlace peptídico o de condensación (C), el cual consta de 450 aminoácidos. Los PKs son una familia muy diversa de productos naturales que son biosintetizados mediante repetidas condensaciones de descarboxilación de Claisen (polimerización de subunidades acetilo y propionilo), entre la unidad extensora y la cadena de policétido creciente. La maquinaria de síntesis de PKs está compuesta de tres dominios principales: Dominio de aciltransferasa (AT), dominio portador de acilo (ACP) y dominio de cetosintasa (KS) (Walsh et al., 2004; Aleti et al., 2015; Summi et al., 2015). Los PKs

producidos por especies de *Bacillus* pueden ser de naturaleza PKs o híbridos entre PKs y NRPs. Para su biosíntesis es importante la participación de una enzima denominada fosfopanteteinil transferasa (PPT), la cual es codificada por el gen *sfp*. Esta enzima es esencial en la activación de los dominios ACP. Mecanismos de biocontrol de cepas de *Bacillus* contra microorganismos fitopatógenos en plantas.

#### **5.6.2.1 *Bacillus subtilis***

Ortega, N., y Stallin, E., (2016) dicen que “*Bacillus subtilis* produce una amplia gama de compuestos con propiedades antifúngicas, como son la surfactina, iturina y fergicinas” (p. 17). Los mecanismos de acción específicos de esta especie son la antibiosis, competencia, inducción de resistencia y promotor de crecimiento. Entre los mecanismos de acción del compuesto antifúngico está la inflamación anormal de las hifas, lisis y degradación completa de la punta de las hifas, además la interferencia de las germinaciones de conidios y esclerocios.

#### **5.6.2.2 *Bacillus pumillus***

Estudios recientes han demostrado que la capacidad biocontroladora de cepas de *B. subtilis* es su capacidad de fijación de nitrógeno y producción de IAA, como CCIBP-C5, esto contribuirá al desarrollo de nuevos productos biofertilizantes. Los resultados de diferentes investigaciones han indicado que el proceso de fijación biológica de nitrógeno representa el 65% del nitrógeno utilizado en la agricultura y es importante en los futuros sistemas de producción de cultivos sostenibles. Según Cruz (2015) “el nitrógeno es necesario para la síntesis celular de enzimas, proteínas, clorofila, ADN y ARN y, por lo tanto, es importante en el crecimiento de las plantas y la producción de alimentos y piensos. El empleo de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y solubilizadas con fosfato en la agricultura podría reducir el uso de fertilización química” (p. 15).

#### **5.6.2.3 Pruebas de Identificación del género *Bacillus***

“El género *Bacillus* está formado por un grupo grande de bacilos grampositivos, catalasa positiva y facultativos caracterizados por la capacidad para formar esporas en condiciones aerobias. Dado que la descripción del género *Bacillus* pone énfasis especial en la formación de endosporas en condiciones aerobias o anaerobias y carecen de citocromos, menaquinonas y actividad de catalasa” (Koneman, E., 2008, p. 739).

**Hemólisis en agar Sangre de Carnero al 5%:** Observación de betahemólisis (hemólisis parcial).

**Movilidad al fresco:** Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y localización varían entre los diferentes géneros y especies. La movilidad al fresco se realiza como procedimiento de primera elección para detectar la movilidad de especies bacterianas que no recorren bien en agar semisólido. (Mejía, 2004)

**Tinción de Gram:** Esta técnica es el procedimiento diferencial más comúnmente utilizado para el examen directo de gran variedad de géneros bacterianos. Divide a las bacterias en Grampositivos que retienen el colorante primario (cristal violeta) y Gramnegativos que pueden ser decolorados. (Matute, 2004) Bacilos Gram positivos, de 1 a 1,3 mm de diámetro por 3 a 10 mm de largo, con bordes cuadrados o cóncavos que forman cadenas largas con la apariencia de vara de bambú. Para observar endosporas es necesario someter el cultivo a condiciones de estrés

### **Pruebas Bioquímicas**

La utilización de los medios de cultivo se basa, en evidenciar la presencia o ausencia de diferentes enzimas, que dirigen el metabolismo bacteriano a lo largo de diversas vías. Un conjunto de enzimas o su carencia discrimina género y especies bacterianas. (Mejía, 2004)

**Lecitinasa:** La prueba de la lecitinasa pone de manifiesto la producción de dicha enzima por determinados microorganismos, capaces de actuar sobre la lecitina, sustancia orgánica nitrogenada y fosfatada, contenida principalmente en la yema de huevo. (Cercenado, 2010)

**Catalasa:** La enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno bajo la fórmula  $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ . De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del  $H_2O_2$ , que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares. (Seija, 2002)

**TSI:** Contiene tres azúcares: dextrosa, lactosa y sacarosa; rojo de fenol para detectar la fermentación de estos carbohidratos, y sulfato ferroso para detectar la producción de ácido sulfhídrico. La degradación o fermentación del azúcar con formación de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador Rojo de fenol que vira de anaranjado-rojizo a amarillo, o por un viraje a rojo intenso en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido por algunos gérmenes a ácido sulfhídrico, el cual reacciona con la sal férrica produciendo sulfuro de hierro de color negro. (Mejía, 2004)

**Movilidad (MIO):** Medio de cultivo altamente nutritivo por la presencia de extracto de levadura, peptona y tripteína. La tripteína aporta gran cantidad de triptófano, sustrato de la enzima triptofanasa a partir del cual se forma indol que puede ser revelado con el reactivo de Ehrlich o de Kovac's por la formación de un compuesto de color rojo. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, la ornitina es el sustrato para la detección de la enzima ornitina decarboxilasa, el púrpura de bromocresol es el indicador de pH, que en medio alcalino es de color púrpura y en medio ácido es amarillo. El agar es el agente solidificante y esta concentración le otorga al medio la propiedad de ser semisólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por el enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea de inoculación del microorganismo en estudio.

**Hidrólisis de arginina:** Este medio se usa para determinar la presencia de la enzima dihidrolasa que convierte la arginina en el producto primario citrulina que luego es convertido en ornitina, el cual se descarboxila para formar putrescina. Este último alcaliniza el medio, lo cual acentúa el color púrpura del medio. (Mejía, 2004)

**Voges Proskauer:** Evalúa la utilización de la glucosa por la vía alterna a la del ácido pirúvico. El producto terminal es el acetyl methyl carbonil (acetoína, 3-hidroxi-2-butanona), un compuesto incoloro que es detectado en dos pasos; la alcalinización del medio con hidróxido de potasio. En presencia de oxígeno, el compuesto vira a lo cual provoca, la oxidación del acetyl-metil-carbinol a diacetilo, al agregarle alfa-naftol, el diacetilo vira a un color zapote intenso. (Mejía, 2004)

**Urea de Christensen:** Detecta la presencia de la enzima ureasa. Cuando la bacteria tiene la enzima, la urea es desdoblada a amonio y CO<sub>2</sub>. El amonio alcaliniza el medio haciendo virar el indicador al rosado intenso. (Mejía, 2004)

**Glucosa:** Se determina si la bacteria es capaz de fermentar la glucosa (producción de ácidos acompañados o no de gases). Se aplica a bacterias con metabolismo fermentador, ensayándose por separado diferentes carbohidratos. (Veroy, 2013)

**L-Arabinosa:** Medio utilizado para evaluar la fermentación de arabinosa. La peptona de caseína proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos. La arabinosa es el carbohidrato fermentable, se manifiesta por un cambio de color del indicador el rojo de fenol que vira de rojo a amarillo. (Veroy, 2013)



**D-Xilosa:** Medio utilizado para evaluar la fermentación de Xilosa. La peptona de caseína proporciona nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, la xilosa es el carbohidrato fermentable, el rojo de fenol es el indicador en la producción de ácido. (Mejía, 2004)

**D-Manitol:** Medio utilizado para evaluar la fermentación de manitol. Debido a su alto contenido de cloruro de sodio, permite solo el crecimiento de microorganismos halotolerantes e inhibe a la mayoría de las bacterias halo-sensibles. El rojo de fenol es el indicador para la detección de la fermentación del carbohidrato D-manitol, cuya degradación da lugar a la producción de ácido cambiando el color del medio, de rosado a amarillo. (Veroy, 2013)

**Sacarosa:** Se utiliza para la identificación bioquímica de microorganismos basándose en su capacidad para fermentar la sacarosa. La peptona de caseína proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos, la sacarosa es el carbohidrato fermentable, se manifiesta por un cambio de color del indicador el rojo de fenol que vira de rojo a amarillo. (Mejía, 2004)

**Maltosa:** Medio utilizado para la identificación bioquímica de microorganismos basándose en su capacidad para fermentar la maltosa. La peptona de caseína proporciona al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos, la maltosa es el carbohidrato fermentable, el rojo de fenol es el indicador de ácido, que se manifiesta por el cambio de color del medio a amarillo. (Veroy, 2013)

**Lactosa:** Medio utilizado para detectar la presencia de la enzima galactósido permeasa, responsable de la fermentación de lactosa.

**Citrato de Simmons:** Medio de cultivo, donde el fosfato monoamónico es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato genera progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos.

**Reducción de Nitratos a nitrito:** La presencia de nitritos en el medio se detecta al agregar el reactivo A (alfa naftilina) y B (ácido sulfanílico) en igual proporción, éstos detectan los nitritos con formación de un colorante rojo intenso de diazonio (para-sulfbencenoazo-alfa naftilamina) después de 1 a 2 minutos, lo cual indica que los nitratos se redujeron a nitritos. Si no se observa

color después del agregado de los reactivos de prueba, indica que no se han reducido los nitratos o que han sido reducidos a productos diferentes a los nitritos como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) (desnitrificación), óxido nítrico (ON) u óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e hidroxilamina. Debido a que los reactivos sólo detectan nitritos, es necesario agregar una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas (incoloras) para confirmar que la reacción es verdaderamente negativa.

La reducción de nitratos a gas nitroso u óxido nitroso se denomina desnitrificación. En el medio caldo, la formación de gas nitrógeno se detecta por la presencia de burbujas de gas en la parte superior del tubo de Durham colocado en forma invertida, la cual es considerado como una reacción positiva. (Mejía, 2004)

En el caso específico de *Bacillus spp* se muestran bacilos grampositivos de 1 a 1,3mm de diámetro. Para la observación de endosporas es necesario someter el cultivo a condiciones de estrés.

### **5.6.3. *Trichoderma harzianum***

Es un hongo anaeróbico que, según Martínez, B., y Infante, D., (2019) “posee la capacidad de producir diversos metabolitos y de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos” (p. 2). Es un habitante natural del suelo, caracterizado por un comportamiento saprófito o parásito. El éxito de las cepas de *Trichoderma* como agentes de control biológico se debe a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos y eficiencia en promoción del crecimiento en plantas e inducción de mecanismos de defensa. Las diferentes especies se caracterizan por tener un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas, que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo.

En las interacciones antagónicas pueden estar involucrados diferentes mecanismos de acción. La multiplicidad de estos en un aislamiento es una característica importante para su selección como agente de control biológico. Dentro de estos mecanismos se encuentran:

Competencia: La competencia por espacio y/o nutrientes ha sido considerada uno de los mecanismos clásicos de biocontrol de este género. Tiene una rápida tasa de desarrollo, lo que hace que sea un fuerte competidor por espacio a la hora de colonizar la rizósfera. Por otra parte, tiene una capacidad superior de moverse y tomar los nutrientes del suelo, siendo muy versátil para

utilizar sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, lo que permite colonizar un medio rápidamente, evitando la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat. Producción de metabolitos (Antibiosis): El género *Trichoderma* tiene la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, que juegan un papel importante inhibiendo el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos. En estas interacciones están involucradas enzimas líticas extracelulares, antibióticos y compuestos de bajo peso molecular, al igual que la producción de esporas, que contribuyen a la colonización de diversos sustratos y del suelo.

Micoparasitismo: Es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, y la actividad lítica. La última etapa consiste en la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma*. Se ha encontrado que algunas especies de este hongo, especialmente *Trichoderma harzianum* tienen el potencial de aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Lo anterior puede explicarse por la inhibición de patógenos menores y a la producción de factores que estimulan el crecimiento de la planta y favorecen la toma de nutrientes.

Antibiosis: Producción de secreciones antimicrobianas por hongos para suprimir o matar hongos patógenos que están a las cercanías de su área de crecimiento. La mayoría de los hongos son capaces de secretar uno o más compuestos.

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diverso en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen estos metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico y estas sustancias inhibitorias fueron consideradas antibióticos.

## **5.7 Métodos microbiológicos de identificación de fitopatógenos (Hongos).**

### **5.7.1 Cámara húmeda**

El método de cámara húmeda reproduce una atmósfera saturada de humedad relativa con el objetivo que se produzca la condensación del vapor de agua existente en el interior, según Cuervo, (2019) “la incubación de tejido foliar sintomatológico en cámara, permite el desarrollo de los signos de la enfermedad. Para ellos se coloca papel filtro estéril que permita la adecuada absorción y retención de humedad” (p. 26).

### **5.7.2 Microcultivo**

Este método permite la identificación de estructuras fúngicas completas, es decir, el micelio en su conjunto.

Sobre este método, Cuervo, (2019) nos dice que:

Con esta técnica se obtienen las distintas fases del ciclo de vida de los hongos, que va de germinación de la espora, formación del tubo germinativo, hifas, micelio, diferenciación de las estructuras reproductivas asexuales y sexuales. Se debe dar un manejo de tiempos en el desarrollo de los hongos para poder observar las estructuras desde el inicio de su formación. Mediante este método se puede observar bajo el microscopio, su crecimiento y esporulación en todos sus detalles y así tener elementos morfológicos de estructuras somáticas y reproductivas completas para así poder hacer la identificación con mayor confiabilidad y conocer a los hongos como agentes causales de enfermedades en los cultivos de importancia agrícola (p. 75).

### **5.7.3 Inoculación directa de tejido foliar:**

Este método permite el aislamiento de la mayor cantidad de fitopatógenos, sin embargo, no es una técnica muy ventajosa porque existe un alto riesgo de contaminación del cultivo.

Castaño, J., (2011), dice que “la inoculación directa es una técnica que permite mayores probabilidades de recuperación del fitopatógeno. Posterior a la adecuada desinfección del tejido foliar enfermo se inocula un trozo directamente en agar Sabouraud, tras el período de incubación se podrá observar el crecimiento de una o más colonias con características distintas” (p. 22).

#### **5.7.4 Cinta adhesiva:**

La técnica de la cinta adhesiva es una variante de la observación microscópica al fresco, permite que las estructuras micológicas de un cultivo fresco se adhieran a la cinta para su posterior visualización con azul de lactofenol.

## 6. PREGUNTAS DIRECTRICES

¿Cómo se identifica la *Mycosphaerella* sp en las parcelas de cultivo de *Musa* sp?

¿Cuál es la capacidad antagónica in vitro de bioconsorcios sobre *Mycosphaerella* sp aislada en cultivo de *Musa* sp, en los ensayos de antagonismo?

¿Cuál es la eficacia y eficiencia de los bioconsorcios de hongos y bacterias sobre un cultivo de *Musa* sp infectada con *Mycosphaerella* sp.?

## 7. DISEÑO METODOLÓGICO

El diseño metodológico es el plan general de la investigación describe como fue recolectada o generada la información y de qué manera fue analizada. Es decir, se especifica los métodos y técnicas que se utilizaron para recolectar las variables medibles de la problemática en estudio. En este se menciona el tipo de información que será recolectada hacia que grupos está dirigida la investigación y cuando ocurrirá esta. Referente a esto Canales et al (1994) expresa que: “el diseño metodológico es la descripción de cómo se va a realizar la investigación”. (p.77).

### 6.1 Área de estudio:

Cultivo de plátano ubicado en la comarca “Las viudas “, en el departamento de Managua. (con coordenadas: 12°05'15.4"N 86°16'05.9"W).

**6.2 Tipo de investigación:** Es una **investigación de tipo experimental**; ya que se manipularon variables de forma controlada para lograr definir de qué forma es más óptimo el control de un fitopatógeno, además el fenómeno estudiado fue medido a través de grupos de estudio de control, siguiendo los lineamientos del método científico (Ruiz, J., 2019).

**6.3 Tipo de Estudio:** Descriptivo de corte transversal, ya que tiene como fin medir características dadas, así como determinar la magnitud y la distribución de estas (Cruz Licea V, & Altamirano A., 2012).

### 6.4 Universo y Muestra

- **Universo:** Área de cultivo de plátano de la empresa de frituras 6R S.A, con un perímetro de 157 metros.
- **Muestra:** Está conformada por 251 plantas de plátano, ubicadas en la platanera propiedad de 6R S.A., las cuales fueron estratificadas en 4 Zonas diferentes, Zona testigo (66 plantas), Zona Hongos (71 plantas), Zona Bacterias (50 plantas), Zona Mixta (64 plantas).

**6.5 Método:** La investigación se desarrolló bajo el método experimental, se realizaron modificaciones en las variables a conveniencia del análisis experimental, por ejemplo, el formar diferentes grupos de análisis (Zonas según aplicación de bioconsorcios) para estudiar y analizar diferentes variables trabajadas (Hongos, Bacterias, tratamiento nulo, incidencia, severidad, etc). Según Serrano, A. (2013), en la investigación de enfoque experimental el investigador manipula una o más variables de estudio, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas. Dicho de otra forma, un experimento consiste en hacer un cambio en el valor de una variable (variable independiente) y observar su efecto en otra variable (variable dependiente) (P. 14).

**6.6 Técnicas e Instrumentos:** Las técnicas para la recolección de datos fue el **análisis documental**, se realizó una ardua búsqueda bibliográfica para sentar bases al proceso investigativo, en donde se logró recolectar información de libros, revistas, informes y otros trabajos investigativos; según Rubio, M., (2015) “El análisis documental es un trabajo mediante el cual por un proceso intelectual extraemos unas nociones del documento para representarlo y facilitar el acceso a los originales” (p. 2). También se utilizó la técnica de tipo de **observación experimental**, ya que se realizaron técnicas experimentales para obtener datos en campo, dentro de esta técnica, se utilizó como instrumento la **ficha de recolección de datos observados**, la cual consistió en un conjunto de parámetros que evalúan síntomas de la enfermedad. Tamayo, C., (2015), dice que la observación experimental “elabora datos en condiciones relativamente controladas por el investigador, particularmente porque éste puede manipular la o las variables” (P. 8).

**6.7 Tipo de muestreo:** El muestreo fue de tipo Probabilístico Estratificado, ya que se estudiaron muestras específicas representativas de un tratamiento en particular para el análisis del mismo. Según datos de QuestionPro (2019) “El muestreo estratificado es un procedimiento de muestreo en el que el objetivo de la población se separa en segmentos (estratos), y luego una muestra aleatoria simple se selecciona de cada segmento (estrato)”, este dato coincide con lo realizado en este trabajo, ya que, del universo, se tomó una población representativa que fue agrupada para el análisis de los diferentes bioconsorcios.



## **6.8 Criterios de inclusión:**

- Plantas presentes en los límites de las zonas de estudio definidas.
- Tejido foliar con síntomas de enfermedad (zonas grisáceas).
- Suelo utilizado para la siembra de plátano.

## **6.9 Criterios de exclusión**

- Zonas de orillas de camino.
- Surcos muertos.
- Sectores de carga de fertilizantes y agroquímicos

**6.10 Análisis y procesamiento de la información:** Para la presente investigación, se obtuvieron datos directamente recolectados del campo de estudio por medio de una ficha de recolección de datos, para posteriormente ser ingresados a una base de datos utilizando el programa Microsoft Excel y Microsoft Word para la redacción final del trabajo. Dicha base de datos contó con los siguientes parámetros a evaluar: Síntomas de la enfermedad (según Fouré), incidencia, severidad, hojas con síntomas, hojas sin síntomas, total de hojas, porcentaje de daño.

## **6.11 Plan de tabulación**

Los datos ingresados en Excel fueron procesados haciendo uso de las diferentes utilidades del mismo para facilitar el análisis de los datos, permitiendo así realizar cálculos de incidencia, severidad, eficacia, eficiencia y valores usados en el estudio. Además, se aprovecharon las características de este programa para la realización de tablas y graficas para la elaboración de análisis y discusión de los resultados obtenidos. Dentro del programa Excel, a las plantas analizadas se les asignó un código compuesto por tres caracteres, el primer que indicó la zona de la planta, el segundo el número de fila y el tercero el número de planta dentro de la fila, seguido de la sintomatología causada por *Mycosphaerella sp*: Pisca, raya, estría, mancha, mancha clorótica, mancha gris, hoja muerta, hojas sin síntoma, hojas con síntomas y porcentaje de daño.

## **6.12. Ética de la investigación**

La presente investigación se realizó con apoyo de Biothecnica S.A., la cual proporcionó datos y cepas para la realización de los diferentes análisis de antagonismo, por ende, el presente trabajo se realizó con objetivos investigativos-académicos sin fines de lucro para los investigadores, tutor o

universidad; el uso de cualquier información, dato o instrumento confidencial de la empresa antes mencionada queda estrictamente prohibido para uso y aprovechamiento personal.

### **6.13 Aplicación de microorganismos benéficos (bioconsorcio)**

Para la aplicación de los microorganismos benéficos usados para el biocontrol se utilizarán los insumos biológicos de **Biotechnica S.A, Bioconsorcio Hongos suelo**® (*Trichoderma harzianum*) y **Bioconsorcio Bacterias**® (*Bacillus subtilis*) ambos con una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc/ ml de producto.

El terreno se dividió en 4 parcelas para la aplicación de los bioconsorcios;

1. **Zona testigo (66 plantas):** En esta zona no se aplicó ningún insumo para el control biológico. Actúa como una zona control, para comparar el comportamiento de la enfermedad con respecto a las zonas de aplicación de bioinsumos.
2. **Control biológico con Bioconsorcio Hongos® (71 plantas),** (*Trichoderma harzianum*  $1 \times 10^8$  ufc / ml). Para la aplicación del tratamiento se diluyó un volumen de Bioconsorcio hongos suelo en agua en una proporción de 50 mL por 20 litros de agua en las primeras 3 aplicaciones. En las últimas 3 aplicaciones se aumentó la fórmula, y se usaron 100 mL de bioconsorcio por 20 litros de agua, esto para acrecentar la población de fitobenéficos. Su aplicación se realizó por aspersión utilizando una bomba mochila manual, procurando que la fórmula cayera principalmente en el haz de las hojas.
3. **Control biológico con Bioconsorcio bacterias® (50 plantas):** (*Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*  $1 \times 10^8$  ufc / ml) Para la aplicación del tratamiento se diluyó un volumen de bioconsorcio Bacterias en agua, en una proporción de 50 mL por 20 litros de agua en las primeras 3 aplicaciones. En las últimas 3 aplicaciones se aumentó la fórmula, y se usaron 100 mL de bioconsorcio por 20 litros de agua, esto para acrecentar la población de fitobenéficos. Su aplicación se realizó por aspersión utilizando una bomba mochila manual, procurando que la fórmula cayera principalmente en el haz de las hojas.
4. **Control biológico mixto (Bioconsorcio bacterias + Bioconsorcio hongos) (66 plantas):** Para la aplicación del tratamiento se diluyeron partes iguales de cada bioconsorcio en un volumen de agua, en proporciones de 50 mL por bioconsorcio en 20 litros de agua en las primeras 3 aplicaciones. En las últimas 3 aplicaciones se aumentó la fórmula y se usaron 100mL de bioconsorcio por 20 litros

de agua. Su aplicación se realizó por aspersión utilizando una bomba mochila manual, procurando que la fórmula cayera principalmente en el haz de las hojas.

#### **6. 14 Toma y procesamiento de la muestra**

Las muestras de tejido foliar sintomatológico fueron tomadas de 10 plantas por cada zona representativa, para esto se utilizó el apoyo de una pinza y bisturíes, las muestras fueron almacenadas en bolsas ziploc estériles y agrupadas según la zona para asegurar una mayor producción de pseudocercosporas.

Las muestras obtenidas fueron rotuladas con los siguientes datos:

- Código de muestra
- Ubicación de la extracción (# de parcela)
- Fecha y hora de extracción
- Nombre del muestreador
- Nombre de la finca

Posterior a la rotulación se procedió a transportar las muestras bajo refrigeración para asegurar la conservación de las mismas, protegiéndolas además de la humedad y el sol. Las muestras fueron almacenadas en Biothecnica S.A bajo refrigeración a 5 °C ( $\pm 0.5$ ) por 48 horas, ya que los muestreos se realizaron los días sábados, en los cuales los laboratorios de docencia del departamento de bioanálisis clínico de la UNAN-Managua están inhabilitados para el trabajo, por ende, las muestras fueron almacenadas y posteriormente procesadas a partir de los días lunes.

##### **6.14.1 Desinfección del tejido foliar**

- Lavar con agua de grifo el tejido foliar con el fin de retirar posible presencia de partículas
- Sumergir el tejido seleccionado en NaClO al 1% por un minuto.
- Lavar con agua destilada estéril.
- Sumergir en Etanol al 70% por 30 segundos.
- Sumergir en agua destilada estéril por 1 minuto.
- Repetir el proceso para cada tejido foliar.

### **6.14.2 Criterios de selección de muestra.**

- Se seleccionaron las hojas con las zonas de mayores signos de enfermedad según escala de Fouré (pisca, raya, estría, mancha, mancha clorótica, mancha grisácea, hoja muerta.)
- La primera toma de muestra se realizó previa a la aplicación de la primera dosis de bioconsorcios, luego se realizaron 4 muestreos paralelos a las aplicaciones.

### **6.14.3 Aislamiento e Identificación**

Las muestras foliares se desinfectaron previo al montaje, pasándolas por 60 segundos en hipoclorito de sodio al 1%, luego se realizó un enjuague en ADE, para sumergirlas por 30 segundos en etanol al 70%.

Dentro de los materiales que se utilizarán para la obtención de la muestra están: Guantes estériles, bolsas con cierres herméticos (bolsa Ziploc), bisturíes, hielera pequeña, hielo, cinta adhesiva y marcador para rotular cada muestra respectivamente.

#### **Aislamiento de Fitopatógenos (*Mycosphaerella*).**

El aislamiento de microorganismos se realizó en medios de cultivo sólidos a partir de muestras individuales tomadas del tejido foliar de la *Musa sp.* Para ello se prepararon previamente medios de cultivo Sabouroad+ gentamicina 0.1%

Para lograr un aislamiento de los hongos fitopatógenos se realizaron varios métodos in vitro para facilitar su identificación, dentro de estos tenemos:

#### **Método de cámara húmeda** (*A partir de tejido foliar con síntomas de sigatoka negra*)

- Se cortaron trozos cuadrados de tejido enfermo con un tamaño aproximado de 1 cm para ser adheridos a papel filtro estéril humedecido con agua destilada estéril, con la parte axial hacia el papel.
- Se colocó el papel con el tejido dentro de la placa Petri estéril.
- Las placas se incubaron a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 72 horas, con monitoreos cada 24 horas hasta observar crecimiento sobre el tejido foliar.

- Posteriormente, se tomaron muestras de la zona con crecimiento con una cinta adhesiva, para observación microscópica directa con azul de lactofenol, con la finalidad de observar pseudosercosporas como identificación preliminar de *Mycosphaerella*.
- Se logró observar pseudocercosporas en el 3er muestreo, sin embargo, se logró aislar en el último muestreo bajo el método de cámara húmeda a partir de una muestra de la zona testigo, esto fue posible ya que en esta zona no hubo aplicación de bioinsumos.
- Con un bisturí estéril se realizó un corte de aproximadamente 6mm de la zona con crecimiento donde se observaron las pseudosercosporas, para un reaislamiento en Sabouraud con gentamicina al 0.1%.
- Se incubó a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 72 horas, monitoreando cada 24 horas.

#### **Inoculación directa de tejido foliar en Agar Sabouraud + gentamicina al 0.1%**

A partir de tejido foliar con síntomas y previamente tratado según protocolo de desinfección se efectuó un corte cuadrado de aproximadamente 15mm con bisturí estéril, que se inoculó directamente en Sabouraud + gentamicina al 0.1%, se incubó por 48 horas a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm$ , con seguimientos cada 24 horas.

#### **6.14.4 Selección de colonias de interés**

- Se seleccionaron las colonias de color gris-oscuro pálido y blanco-rosa, en la parte anverso, y de apariencia compacta, centro negro, y bordes blancos e irregulares en la parte reversa (colonias descritas según Stover, 1976).
- También se seleccionaron las colonias cuya aparición fue recurrente durante todo el período de estudio.
- A partir de las colonias de interés se tomó una muestra de los bordes con una cinta adhesiva, para observación microscópica directa con azul de lactofenol, con la finalidad de observar conidios de pseudosercosporas, como identificación preliminar de *Mycosphaerella*.
- A las colonias que persistieron durante todo el periodo de análisis también se les realizó un análisis microscópico con azul de lactofenol.

**Microcultivos:** Esta técnica empleada favoreció la esporulación de los hongos.

Posterior a la incubación se cortó un cuadro de agar de 1 a 1.5 cm y se colocó sobre una lámina portaobjeto, se tomó un repique de las colonias diferenciadas observadas por sus características macroscópicamente y se sembrarán en los costados del cuadro recortado de Sabouraud y por último se colocó una lámina cubreobjetos en la parte superior del recuadro.

### **Reaislamiento**

- Se hicieron repiques a partir de las unidades formadoras de colonia de interés en medios Sabouraud +0.1% Antibiótico.
- Se incubó a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 48 horas, hasta 7 días en caso de los aislamientos fúngicos en SB + 0.1%, con monitoreos cada 24 horas, corroborando la ausencia de hongos contaminantes.
- También se realizó un repique de los tejidos foliares en cámara húmeda con la finalidad de observar pseudocercosporas características de *Mycosphaerella sp.*

### **Aislamiento de Fitobeneficos (*Bacillus spp*) Aislamiento primario**

El cultivo directo se llevó a cabo por la desinfección del trozo de tejido foliar de la planta localizada en la zona bacterias colocando la parte adaxial del tejido en un plato Petri con agar TSA incubadas a  $35^{\circ}$  durante 24 horas. Se realizó tinción de Gram para constatar la presencia bacilos esporulados.

### **Reaislamiento**

Se realizó el reaislamiento de las colonias macroscópicamente características del género *bacillus* en ASC al 5% y TSA, en ambas placas se realizó un estriado por agotamiento.

### **Identificación morfológica.**

Se seleccionaron las colonias que presentaron las siguientes características descritas por Realpe, M., (2002):

“Colonias de 2-4 mm de diámetro, betahemolíticas, con aspecto liso, mucoide o rugoso; con bordes ondulados o extendidos que ocasionalmente da la apariencia de cultivos mixtos” (p. 207).

### **Tinción de gram:**

- Cubrir el frotis ya fijado y frío con cristal violeta, dejar el colorante actuar por un minuto.

- Enjuagar, dejando resbalar el agua con un chorro suave. Escurrir muy bien.
- Cubrir con Lugol y dejar por un minuto.
- Repita el numeral.
- Aplicar 2 ó 3 gotas de alcohol acetona (1:1) o alcohol 70° y balancear la lámina de tal manera que se pueda observar la decoloración. El tiempo adecuado es aquel en que las partes más gruesas han dejado de decolorar al realizar el balanceo.
- Inmediatamente repita el numeral.
- Cubrir el frotis con safranina o fucsina acuosa durante 30 segundos.
- Enjuagar, dejando resbalar el agua con un chorro suave. Escurrir muy bien.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Examinar en el microscopio con lente de inmersión, empleando aceite de inmersión.
- Pruebas de antagonismo in vitro

### Pruebas bioquímicas

Prueba Bioquímica
Lecitinasa
Crecimiento en Agar Sangre 5%
BETA- Hemólisis
Catalasa
TSI
Movilidad
Arginina
Voges Proskauer
Urea de Christensen
Glucosa
L-arabinosa
D-xilosa
D-Manitol
Sacarosa
Maltosa
Lactosa
Utilización del Citrato
Reducción de Nitrato

## Pruebas de antagonismo

Para la realización de las pruebas de antagonismos se colocaron en un plato con agar Sabouraud dos recortes de colonias puras, un recorte del fitopatógeno y uno del fitobenéfico, y se colocaron en distancias paralelas a 1 cm del borde del plato, se incubaron y se le realizó un análisis periódico del crecimiento de ambas colonias y mediciones diarias de su desarrollo, para poner en evidencia un versus entre una y otro.

Como parte de la evaluación del efecto antagónico in vitro se realizó el análisis del porcentaje de inhibición y tasa de crecimiento, estos se realizaron aplicando las fórmulas descritas a continuación (Méndez, J., 2018):

Ecuación 1

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left( \frac{\text{DCC}-\text{DCP}}{\text{DCP}} \right) \times 100$$

Donde:

DCC: Diámetro de la colonia problema (fitopatógeno)

DCP: Diámetro de la colonia problema (Fitopatógeno en presencia del antagonista).

Ecuación 2

$$\text{Tasa de crecimiento} = \left( \frac{\text{Cf}-\text{Ci}}{\text{Tf}-\text{Ti}} \right)$$

Donde:

Cf: Crecimiento final del fitopatógeno

Ci: Crecimiento inicial (día 1)

Tf: Tiempo final de crecimiento

Ti: Tiempo inicial (día 1)

## 6.15 Criterios de calidad

**Controles ambientales:** Para corroborar la ausencia de microorganismos contaminantes dentro del laboratorio de docencia N°3 del departamento de bioanálisis clínico se realizaron ensayos de sedimentación pasiva.



- Se colocaron 3 placas de agar Sabouraud en 3 puntos distintos del laboratorio (mesa de trabajo con mecheros, incubadora de hongos, mesa de trabajo sin mechero)
- Las placas permanecieron abiertas por 15 minutos previos y posteriores al uso de los laboratorios, sin flujo de personas y con puertas cerradas. Este procedimiento se repitió en todas las visitas al laboratorio.

### **Controles de esterilidad de proceso e instrumentos**

- Se inocularon 100 ul de agua destilada en una placa de agar Sabouraud.
- Se realizó un estriado por agotamiento
- Se incubó por 24 horas a 27°

Este procedimiento se efectuó con el propósito de corroborar la esterilidad del agua destilada utilizada para procedimientos como preparación de medios de cultivo y humedecimiento de cámara húmeda.

### **Controles positivos y negativos**

**Control negativo:** Suero Estéril.

- El montaje del control negativo se efectúa como el procesamiento de una muestra adicional

**Control positivo:** Cepas aisladas de bioinsumos y provistas por Biotechnica.

1. Cepas aisladas de los productos **Bioconsorcios Hongos®** (*Trichoderma harzianum*) y **Bioconsorcio Bacterias®** (*Bacillus subtilis*)
2. Para la identificación se utilizarán las claves taxómicas para contrastar las características suficientes, hasta eventualmente identificar al agente etiológico de la Sigatoka negra.

### **6.16 Análisis de Incidencia y Severidad**

Para el análisis de la incidencia y la severidad de la enfermedad, se utilizó una ficha de observación en donde se marcaban los códigos de las plantas según su zona, su fila y el número de planta, seguido de la sintomatología presenten, característica de sigatoka negra. Para este análisis se tomaron en cuenta el total de hojas por planta, el número de hojas sanas y el número de hojas

enfermas para obtener un valor porcentual de la incidencia, la cual se obtuvo de la división entre el número de hojas enfermas por el número de hojas sanas.

Según Castillo, T., (2016, p. 26), la fórmula aplicada se observaría de la siguiente manera:

$$\text{Incidencia \%} = \left( \frac{\text{Número de hojas con síntomas}}{\text{Total de hojas}} \right) \times 100$$

La ficha de observación con los criterios antes descritos sirvió para recopilar la información necesaria para medir severidad e incidencia. Una vez calculada la incidencia, fue promediada por cada zona, en el transcurso de las 6 semanas de estudio. Por otra parte, la severidad, es el porcentaje de la superficie foliar muestreada cubierta por signos, manchas y pústulas de enfermedad, por lo tanto, se tomó como referencia la cantidad de síntomas que presentaba cada planta, donde cada síntoma equivale a un 12.5% de daño, esto se multiplicó por la severidad, pues esta marcó la gravedad de la infección, este resultado se dividió entre 100 (valor constante).

$$\text{Severidad} \left( \frac{\% \text{ de incidencia} * [X * 12.5\%]}{100} \right)$$

Donde X es el número de síntomas presentes en la planta.

### **6.17 Análisis de Eficiencia y Eficacia**

Para el análisis de la eficacia y eficiencia fueron necesario los valores de incidencia y severidad tomados en los diferentes muestreos, la eficacia se calculó como el porcentaje de hojas sanas respecto al control (zona testigo); a través de la siguiente fórmula:

Se realizó un promedio de los valores de hojas sanas y hojas enfermas para obtener un resultado directo.

Para el análisis de eficiencia se utilizó la relación entre el tiempo previsto para efectuar este estudio y el tiempo total multiplicado por el porcentaje de eficacia de cada zona, obteniendo así un producto como resultado para la eficiencia, representado en la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = \left( \frac{\text{Tiempo Utilizado}}{\text{Tiempo Previsto}} \right) \times \% \text{ de eficacia de cada zona}$$

### 6.17 Operacionalización de Variables

Variables	Sub-variables	Indicador	Valores	Criterios
Identificación de Fitopatógenos	Cultivo en Agar Sabourad	Características macroscópicas	Cultivo Positivo ( ) Cultivo Negativo ( )	<i>Mycosphaerella Fijiensis</i> <i>Pseudocercospora fijiensis</i>
		Características microscópicas (Pseudocercosporas)  Sintomatología de las plantas	Estructuras micológicas específicas	
Bioconsorcios in sitio	Zona testigo	Zona sin aplicación	Estructuras micológicas específicas	Características Macroscópicas  Características microscópicas
	Zona Biocorsorcio Hongos	Hongos benéficos		
	Zona Bioconsorcio Bacterias	Bacterias benéficas		
	Zona Mixta	Hongos y bacterias benéficas		
Capacidad de los Bioconsorcios	Plantas con síntomas y sin síntomas	Grado de infección Productividad	Lesiones o puntos de color blanco-amarillento a marrón de 1mm de longitud.  de Antagonismo in vitro	En plantas de 3 metros: % de plantas libre de infección temprana.  Tasa de crecimiento Micoparasitismo

## 8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 8.1 Identificación de *Mycosphaerella spp* en las parcelas de cultivo de *Musa sp* ubicado en la comarca “Las viudas”, departamento de Managua.

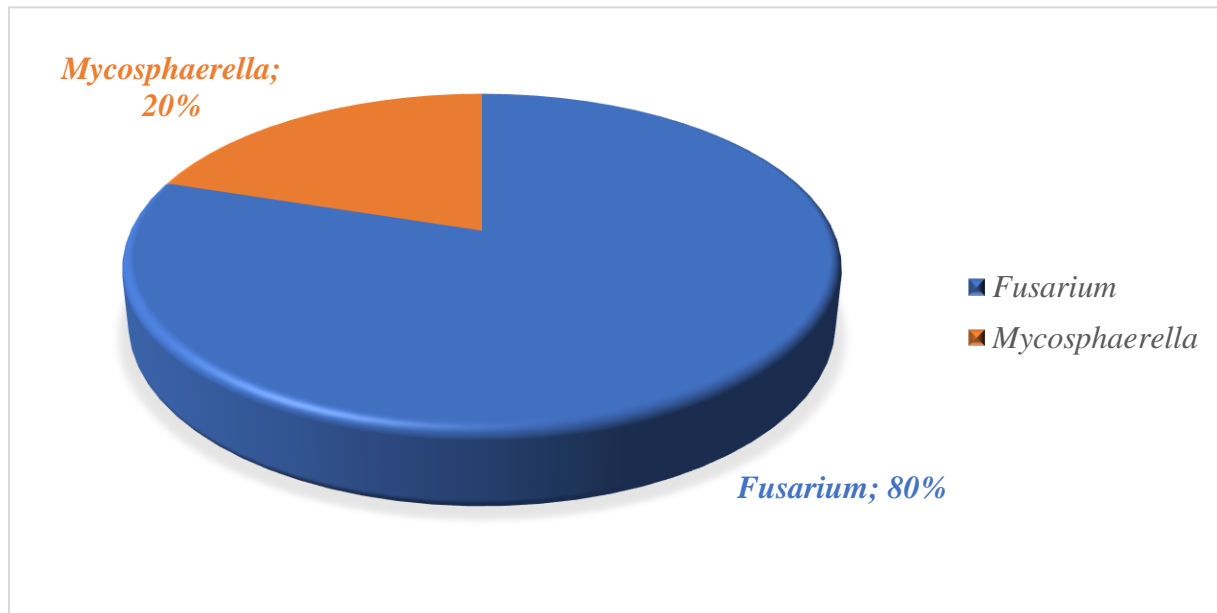
En el primer muestreo realizado no se logró el aislamiento, ni la observación macroscópica/microscópica, de *Mycosphaerella sp*. En el segundo muestreo se observaron colonias características del género *Fusarium sp*, a partir de los cultivos de tejido foliar sintomatológico, obtenido de las cuatro zonas muestreadas (Zona testigo, zona bacterias, zona hongos, zona mixta). En la tercera semana se observaron pseudocercosporas de *Mycosphaerella sp* a partir del método de cámara húmeda; se realizó el respectivo procedimiento de reaislamiento con el objetivo de obtener un cultivo axénico de *Mycosphaerella spp*, sin embargo, por diversos factores asociados a contaminaciones este no se logró.

Se continuó observando la presencia colonias con características macroscópicas de *Fusarium sp*, por microscopía convencional se observaron macroconidias, estructuras típicas de este género. En el cuarto muestreo se realizó nuevamente el aislamiento de *Fusarium sp*. sin embargo el fitopatógeno de interés no se hizo presente hasta el quinto y último muestreo, donde se lograron observar a partir del método de cámara húmeda, pseudocercosporas de *Mycosphaerella sp*. se reaisló y se logró obtener un cultivo axénico del mismo.

El aislamiento de *Fusarium sp* de forma persistente fue un claro indicador de una infección mixta en el cultivo de plátano (*Musa sp*). Dichos aislamientos axénicos se realizaron para las posteriores pruebas de antagonismo in vitro.

En la gráfica a continuación se observan los porcentajes de aislamiento de fitopatógenos, donde *Fusarium sp* fue aislado e identificado en un 80% de los muestreos (4 muestreos) y *Mycosphaerella spp* en un 20 % (1 muestreo).

**Gráfica 1.** Distribución porcentual de fitopatógenos foliares aislados en las 4 zonas de estudio de los 5 muestreos realizados en el período comprendido entre el 24 de julio y 5 de noviembre de 2021 en un cultivo de *Musa sp.*



Fuente: Autores de monografía

Se realizó la búsqueda de *Mycosphaerella sp* a partir a las muestras recolectadas en los 5 muestreos efectuados teniendo como indicadores de campo la sintomatología característica de Sigatoka negra, sin embargo, se encontró de los aislamientos, que los agentes etiológicos responsables de dicha sintomatología (manchas amarillentas o cloróticas, con rayas oscuras de color pardo, parcialmente decaídas) en el cultivo de *Musa sp.* fueron *Fusarium spp* y *Mycosphaerella sp.* Se observó una mayor prevalencia de aislamientos de *Fusarium sp.* en un 80% de los muestreos es posible justificar este fenómeno gracias a “la capacidad que posee *Fusarium* para formar una densa red de hifas sobre la superficie de la raíz. Estas hifas forman rápidamente una densa red hacia el ápice de la nervadura en un período menor a 48 horas” (Gonzales, I., y Arias, Y., 2012). Mientras que *Mycosphaerella sp.* tarda según Enríquez, J., (2015) “hasta 72 horas para que las esporas germinen y penetren el tejido de la planta” (p. 31). Además, *Mycosphaerella sp.* tiene un período de crecimiento y desarrollo que sobrepasan las 24 horas por sobre *Fusarium sp.* lo que contribuya a que este último prolifere con mayor rapidez, lo que se traduce a una mayor competitividad de espacio y sustrato, esto facilitó su aislamiento. Otro factor importante a tener en cuenta fue el

período de tiempo en que se realizaron los muestreos, ya que, en este, las precipitaciones fueron mayores, lo que permite el crecimiento de las poblaciones de fitopatógenos, en especial, *Fusarium sp*, el cual, según Lara, D., (2009), “con las lluvias las esporas del patógeno son transportados e infectan nuevas áreas” (p. 7). Por otra parte, el fitopatógeno puede infectar raíces de ciertas malezas sin provocar síntomas visibles y pueden permanecer en estas plantas en ausencia de banano.

La caracterización de *Fusarium sp*. se realizó por medio de claves taxonómicas, características microscópicas y macroscópicas.

Macroscópicamente se observaron colonias algodonosas de color rosado mamón en la parte anversa, y de aspecto compacta naranja en la parte reversa. Se logró la observación de fiálides mediante microscopía directa con azul de lactofenol a partir de un cultivo axénico en agar Sabouraud más gentamicina al 0.1%, también, se observaron macroconidias en forma de medialuna, hialinas y septadas. Todas estas características coinciden con las mencionadas por Villalobos, V., (2020), el cual describe que “La fiálide es generalmente fina, en forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas. Los macroconidias presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Los microconidias, son ausentes en algunas especies” (p.6).

Por otro lado, se logró aislar *Mycosphaerella sp* en el último muestreo realizado, a partir de la zona testigo. Este fenómeno se justifica gracias a la ausencia de tratamientos químicos o biológicos, siendo la zona más afectada y con mayor carga de los fitopatógenos responsables de la enfermedad.

## **8.2 Comparación in vitro de la capacidad antagónica de bioconsorcios de hongos y bacterias sobre *Mycosphaerella sp* y *Fusarium sp*.**

Como parte del método de evaluación de los bioconsorcios y los microorganismos que estos poseen, se realizaron diferentes métodos de análisis, tanto in vivo, como in vitro, esto con el objetivo de tener un fundamento y soporte de la eficacia y eficiencia de los mismos y así demostrar la capacidad que poseen frente a microorganismos fitopatógenos.

Como parte de lo antes descrito, se realizaron pruebas de antagonismo enfrentando el microorganismo benéfico presente en el bioconsorcio hongos (*Trichoderma harzianum*) y los dos fitopatógenos aislados (*Fusarium sp* y *Mycosphaerella sp*). Cabe destacar que no fue posible realizar pruebas de antagonismo con el bioconsorcio Bacterias (a base de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*) por la dificultad que representa cultivar este género bacteriano. Sin embargo, como parte del control de calidad interno, para esta investigación se realizó en paralelo al aislamiento de fitopatógenos, el aislamiento e identificación de *Bacillus sp* a partir de la zona bacterias posterior a la aplicación de bioconsorcios; esto para corroborar la presencia de este género bacteriano en el bioinsumo. El procesamiento de estas muestras se realizó en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR), laboratorio que cuenta con todos los recursos para el cultivo de dicho género. (Ver anexo 2. Tabla 1)

### **Selección de los aislamientos antagonistas.**

Como antagonista in vitro se utilizaron cepas control de *Trichoderma harzianum* BT07 y BT08 del banco de Cepas de Referencia proporcionada por Biothecnica S.A., siendo esta la misma utilizada en la formulación de los bioconsorcios de hongos. Dicha cepa ya evaluada y caracterizada por la empresa.

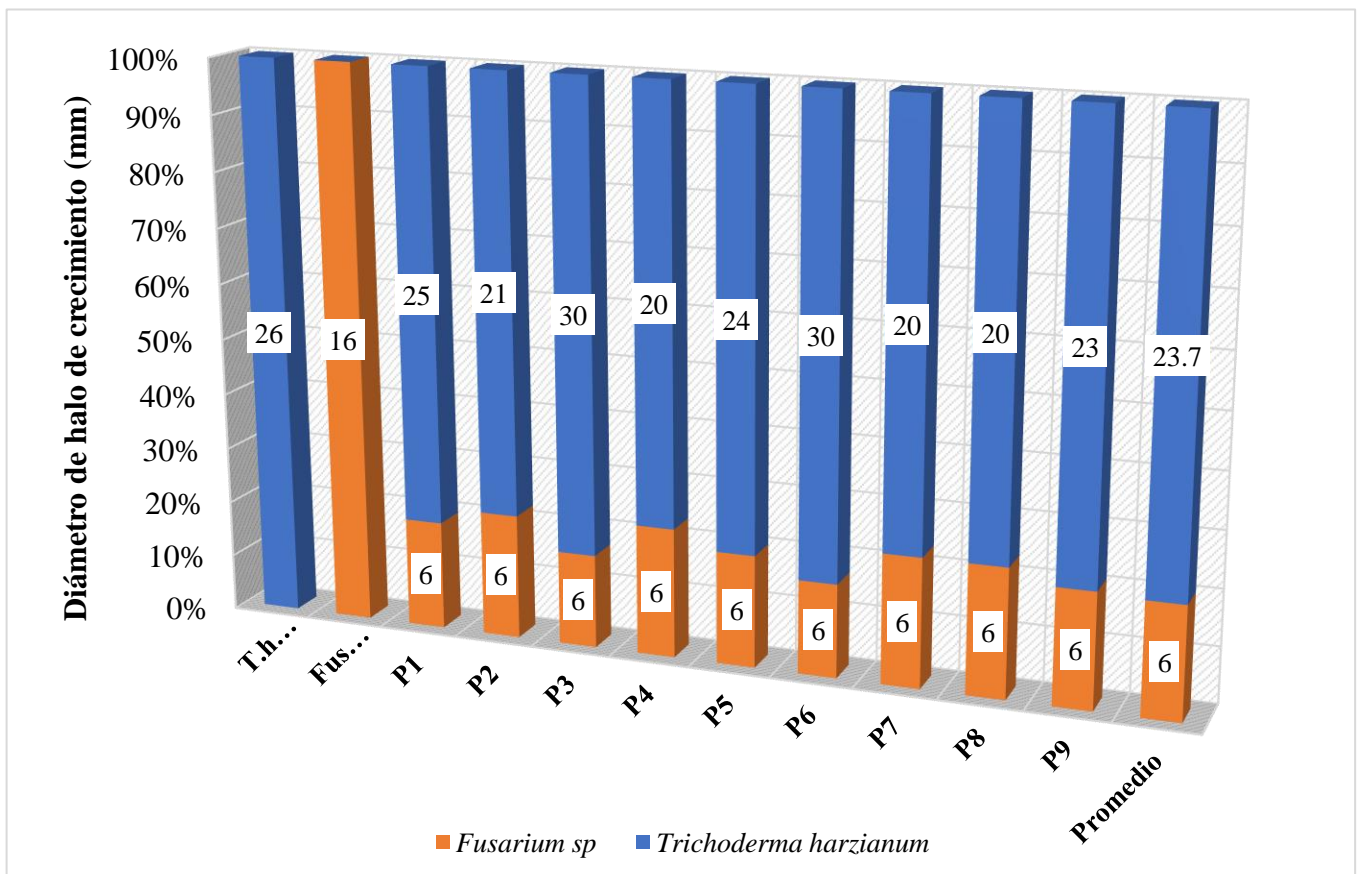
### **Selección de los patógenos.**

*Fusarium sp.* fue aislado en el 80% de los muestreos de las plantas sintomatológicas, sobresaliendo como el principal patógeno del plantío, este fue identificado utilizando las respectivas claves taxonómicas (Watts, 2015, p. 10) , por otra parte, *Mycosphaerella sp.*, se aisló en el 20% de los muestreos.

## Control biológico in vitro

Las pruebas de antagonismo se realizaron empleando la técnica de cultivo dual en platos Petri con agar sabouraud más gentamicina al 0.1%, se colocó en un extremo del plato a una distancia de 1 cm del borde, una porción circular de 0.5 cm de diámetro de agar con el patógeno desarrollado (más de 72 horas de incubación), y en paralelo se colocó otra porción circular de 0.5 cm del fitobenefico (*Trichoderma harzianum*) Esto se realizó por repetición, 9 veces por cada patógeno, el análisis se llevó a cabo realizando la medida de los radios de ambos microorganismos cada 24 horas por 7 días (excluyendo los fines de semana y días festivos), o hasta que el crecimiento de ambos microorganismos cubriera la superficie total del medio de cultivo.

**Gráfica 2.** Primera lectura en milímetros (9 placas) de prueba de antagonismo, a las 24 horas de incubación enfrentando *Fusarium sp* versus *Trichoderma harzianum*



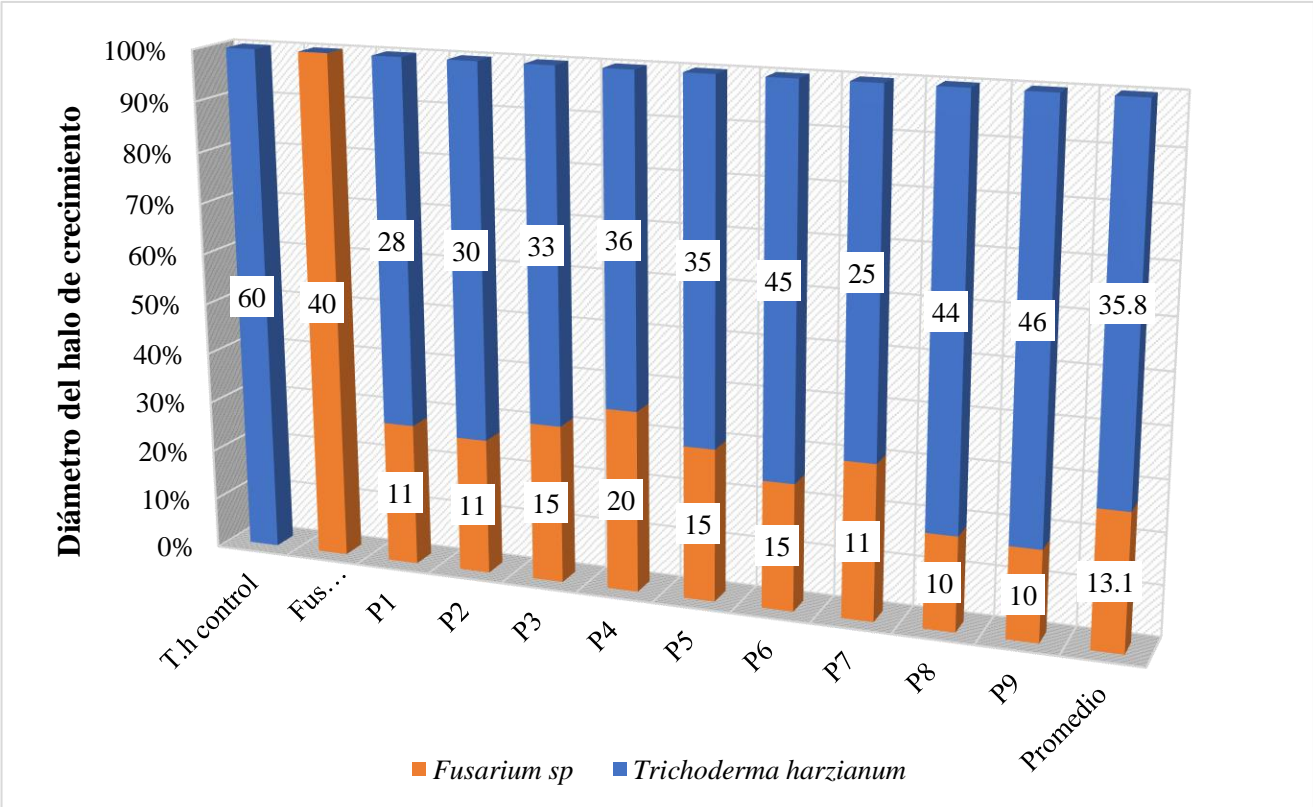
**Leyenda:** T.h control – placa control de *Trichoderma harzianum* sola, Fus control- placa control- placa control de *Fusarium sp* sola, P= placa

**Fuente:** Autores de monografía



Posterior a las 24 horas de incubación, las medidas de los halos de *Trichoderma harzianum* oscilaron entre los 20mm y 30mm, dando los primeros indicios del efecto competitivo e inhibidor sobre el fitopatógeno (*Fusarium sp*).

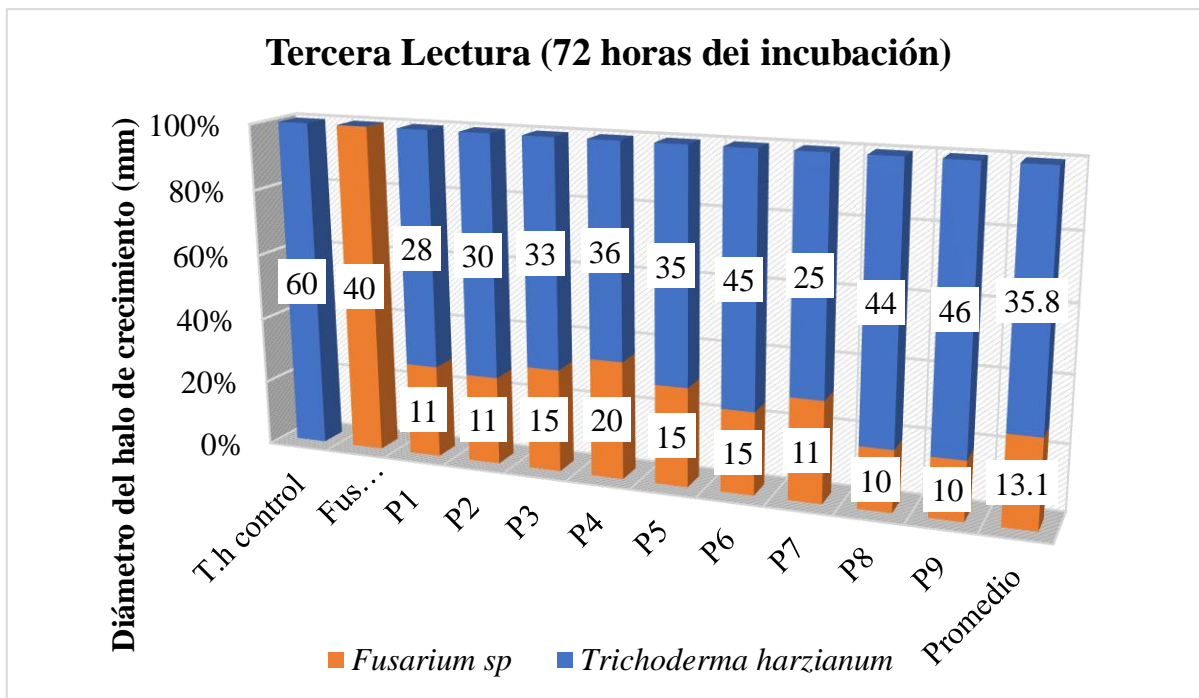
**Gráfica 3.** Segunda lectura en milímetros (9 placas) de prueba de antagonismo, a las 48 horas de incubación enfrentando *Fusarium sp* versus *Trichoderma harzianum*



**Leyenda:** T.h control – placa control de *Trichoderma harzianum* sola, Fus control- placa control de *Fusarium sp* sola, P= placa  
**Fuente:** Autores de monografía

En la segunda lectura a las 48 horas de incubación, el control del fitopatógeno (*Fusarium sp*) alcanzó un halo de 40mm de diámetro, sin embargo, en presencia del antagonista (*T. harzianum*) su crecimiento se vio inhibido, obteniéndose lecturas de halos de 10mm a 20mm.

**Gráfica 4.** Tercera lectura en milímetros (9 placas) de prueba de antagonismo, a las 72 horas de incubación enfrentando *Fusarium sp* versus *Trichoderma harzianum*



**Leyenda:** T.h control – placa control de *Trichoderma harzianum* sola, Fus control- placa control de *Fusarium sp* sola, P= placa

**Fuente:** Autores de Monografía

A las 72 horas de incubación el crecimiento de los microorganismos cubrió toda la superficie del medio de cultivo, por esta razón solo se efectuaron 3 lecturas. En relación a *Fusarium sp* y *Trichoderma harzianum* el fitobenefico (*Trichoderma harzianum*) tuvo mayor crecimiento.

El antagonismo de este se comprobó mediante el análisis de variables como el radio del crecimiento del patógeno. El micoparasitismo, la competencia por nutrientes y espacio se valoró comparando la tasa de crecimiento de ambos microorganismos enfrentados.

De acuerdo a lo antes descrito, en comparación a la primera, segunda y tercera lectura, se determinó que *T. harzianum* se desarrolla a una velocidad superior a la de *Fusarium*, pues al cabo de 3 días su diámetro en promedio fue de 44.4 mm, diámetro mayor comparado al de *Fusarium sp*, el cual apenas rondaba los 15 mm. Estos datos concuerdan con los expuestos por Fernández, R., y Suarez, C., (2009), donde “encontraron que los aislamientos de *T. harzianum* se desarrollaron a una velocidad superior a la de *F. oxysporum*. Debido a que los aislamientos del antagonista tuvieron

un crecimiento promedio de 7,42 cm al décimo día en enfrentamiento, mientras que el patógeno mostró un crecimiento limitado en cultivo dual, con un promedio de 1,99 cm al décimo día” (p. 4).

### **Tasa de crecimiento**

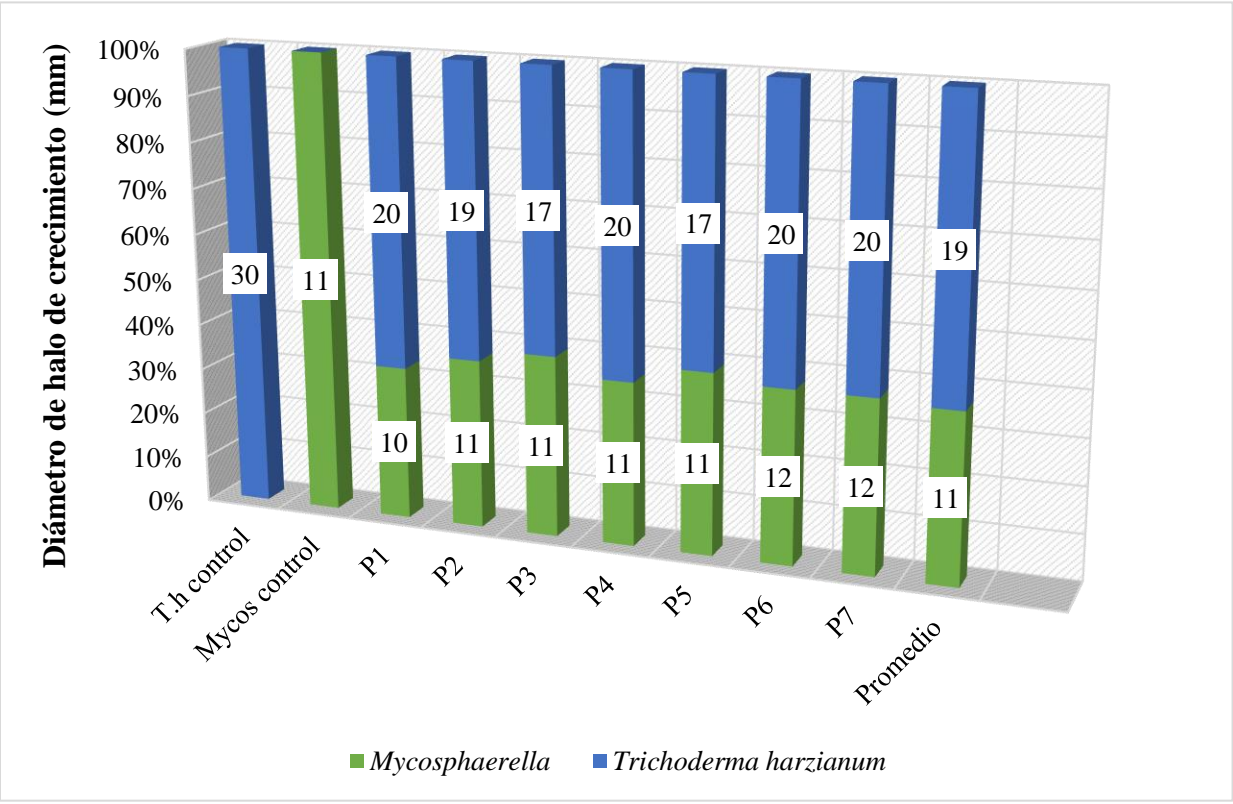
La tasa de crecimiento de *Fusarium spp*, aislado a partir de las muestras de tejido foliar sintomatológico presenta una tasa de crecimiento de 0.97mm/hora; estos datos difieren con los encontrados en otras bibliografías, que indican una tasa de crecimiento menor, como es la expuesta por Herrera, R, (2016), que indica que “la tasa de crecimiento de *Fusarium* fue de 0.358 mm/hora. Esto se justifica debido a las diferencias entre especies de *Fusarium*, pues en esta investigación no se logró definir la especie de *Fusarium* por limitantes económicas para efectuar un estudio molecular identificativo.

### **Porcentaje de inhibición**

El porcentaje de inhibición fue de 61.4%, un porcentaje similar al de Paéz (2007) que indicó “que los informes del porcentaje de inhibición de *Fusarium* por *Trichoderma* muestran valores del 22,5 al 86,44 %” (p.164). Estos demuestran que el porcentaje de inhibición de *Trichoderma harzianum* es superior al de *Fusarium spp*.

De igual manera, se empleó la técnica de cultivo dual en platos Petri con agar sabouraud más gentamicina al 0.1%, enfrentando *Mycosphaerella sp* y *Trichoderma harzianum*. Se colocó en un extremo del plato a una distancia de 1 cm del borde, una porción circular de 0.5 cm de diámetro de agar con el patógeno desarrollado (más de 72 horas de incubación), y en paralelo se colocó otra porción circular de 0.5cm del fitobenéfico (*Trichoderma harzianum*). Esto se realizó por repetición, 7 veces por cada patógeno, el análisis se llevó a cabo realizando la medida de los radios de ambos microorganismos cada 24 horas por 7 días (excluyendo los fines de semana y días festivos), o hasta que el crecimiento de ambos microorganismos cubriera la superficie total del medio de cultivo.

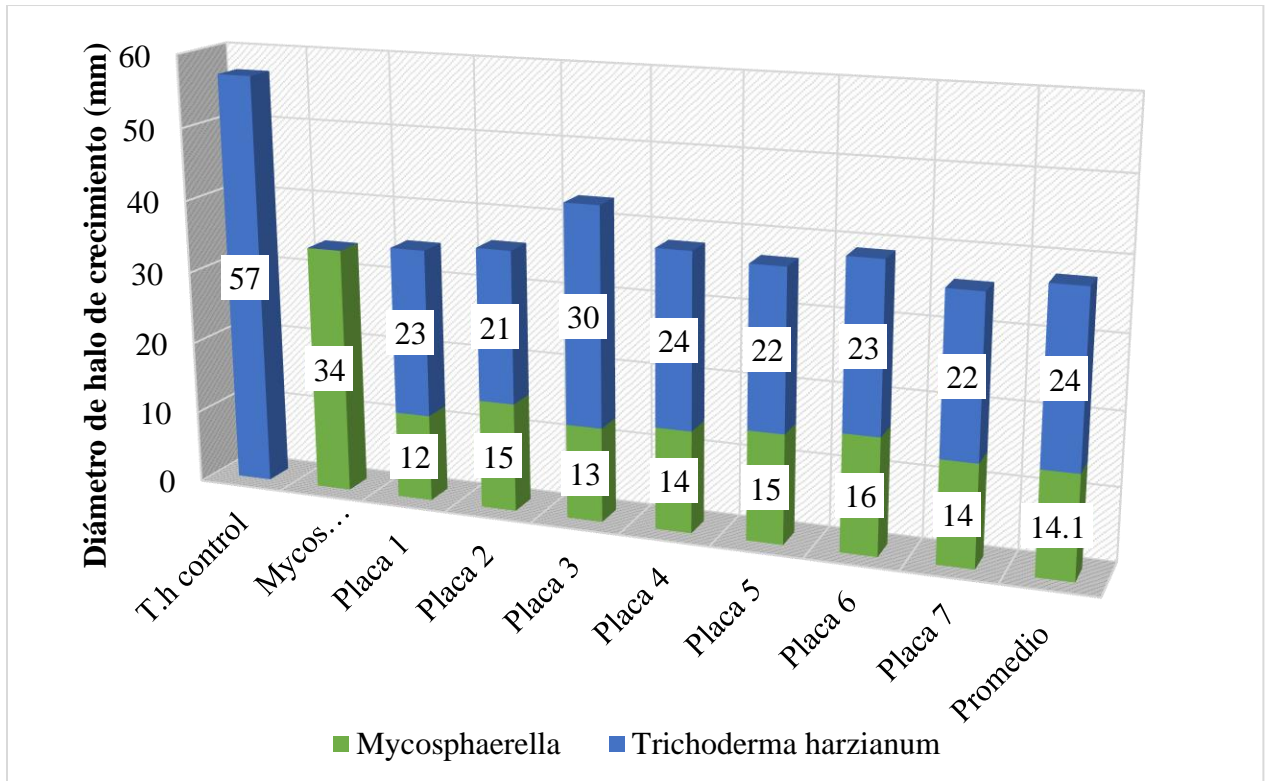
**Gráfica 5.** Primera lectura en milímetros (7 placas) de prueba de antagonismo, a las 24 horas de incubación enfrentando *Mycosphaerella* versus *Trichoderma harzianum*



**Leyenda:** T.h control – placa control de *Trichoderma harzianum* sola, Mycos control- placa control de *Mycosphaerella sp* sola, P= placa  
**Fuente:** Autores de Monografía

Posterior a las 24 horas de incubación, los diámetros de los halos del fitobenéfico (*T. harzianum*) oscilaron entre 17mm y 20mm. En la primera lectura no se observó diferencias entre el desarrollo *Mycosphaerella sp* en solitario (control) y en presencia del antagonista, ya que las medidas de los diámetros de los halos oscilaron entre los 10mm y los 12mm.

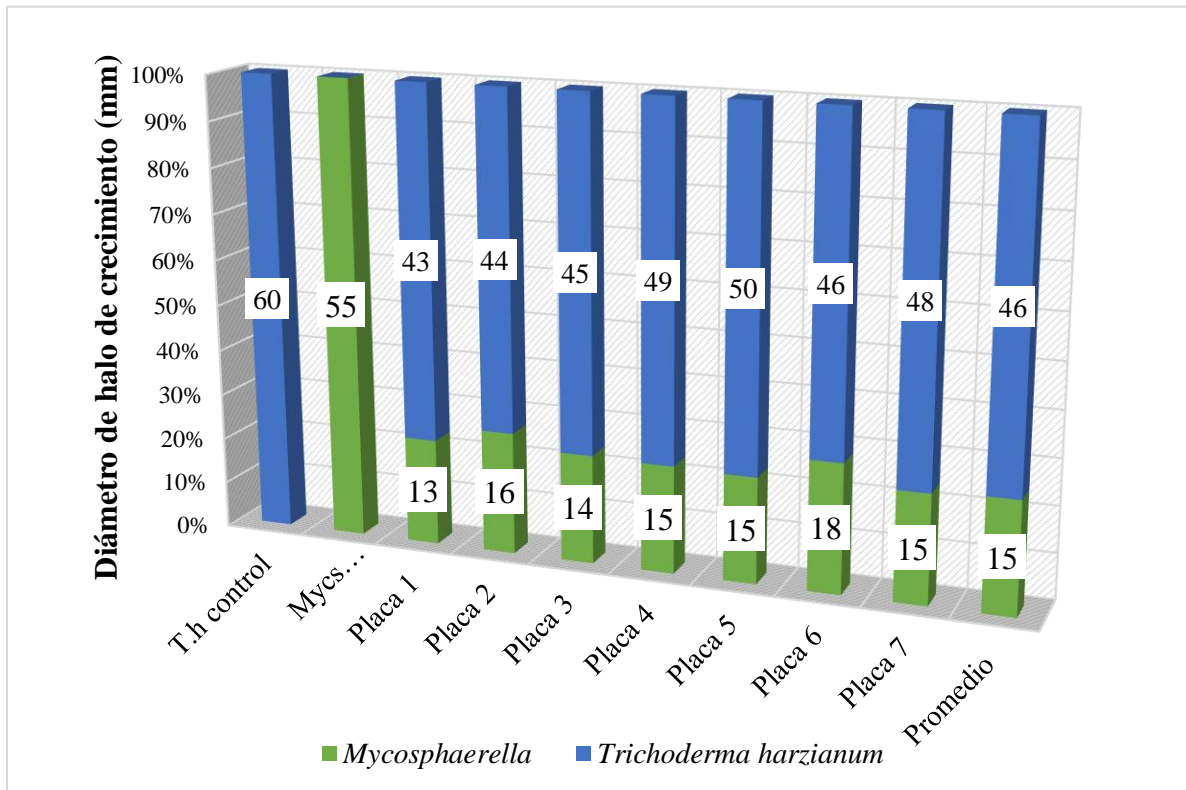
**Gráfica 6.** Segunda lectura en milímetros (7 placas) de prueba de antagonismo, a las 48 horas de incubación enfrentando *Mycosphaerella* versus *Trichoderma harzianum*



**Leyenda:** T.h control – placa control de *Trichoderma harzianum* sola, Mycos control- placa control de *Mycosphaerella sp* sola, P= placa  
**Fuente:** Autores de Monografía

En la segunda lectura a las 48 horas de incubación, se empieza a observar la inhibición del fitopatógeno en presencia del antagonista, ya que el control de crecimiento de *Mycosphaerella sp* en solitario alcanzó un halo de 34 mm, mientras que las placas de cultivo dual (prueba de antagonismo) no sobrepasan halos de 16mm.

**Gráfica 7.** Tercera lectura en milímetros (7 placas) de prueba de antagonismo, a las 72 horas de incubación enfrentando *Mycosphaerella* versus *Trichoderma harzianum*



**Leyenda:** T.h control – placa control de *Trichoderma harzianum* sola, Mycos control- placa control de *Mycosphaerella sp* sola, P= placa  
**Fuente:** Autores de Monografía

Se efectuaron 3 lecturas, debido a que a las 72 horas de incubación el crecimiento de los microorganismos cubrió la totalidad de la superficie del medio de cultivo. Las medidas de los halos del fitopatógeno oscilaron entre los 13-16mm, por otra parte, los halos del fitobenéfico alcanzaron medidas superiores a los 43 mm

Se evaluaron 7 de 9 placas, ya que dos de ellos resultaron contaminados a las 24 horas. Como se observa, *T. harzianum* posee un mayor radio de crecimiento en relación al patógeno, en donde en promedio este lo supera en 31 mm, demostrando así la competitividad por sustratos y espacios,; esto también se vio reflejado en un estudio realizado por Bernal, A., (2018) “en el cual obtuvo un valor de eficiencia de 98,0 %”, (p. 3), siendo este un valor muy elevado en comparación a nuestros resultados, sin embargo estos coinciden en que el fitobenéfico posee una buena respuesta de control frente a *Mycosphaerella sp*.

### **Tasa de Crecimiento de *Mycosphaerella spp***

La tasa de crecimiento de *Mycosphaerella spp*, aislado a partir de las muestras de tejido foliar sintomatológico presenta una tasa de crecimiento de 0.61 mm por hora.

### **Porcentaje de inhibición**

El porcentaje de inhibición de *Trichoderma harzianum* fue de 80.9%, esto indica que probablemente, *Trichoderma harzianum* pudo tener una tasa de metabolismo, tasa de incorporación de nutrientes y un crecimiento superior a *Mycosphaerella* utilizando distintos mecanismos como secreción de enzimas hidrolíticas, entre ellas celulasas, quitinasas, glucanas, xylasas y proteasas, las cuales pueden estar implicadas en los mecanismos de biocontrol, permitiéndole al antagonista privar al fitopatógeno mediante el aprovechamiento de los nutrientes del medio.

### **8.3 Valoración de la eficacia y eficiencia de bioconsorcios de hongos y bacterias mediante la aplicación in vivo de los bioinsumos.**

Se valoraron los bioconsorcios con un análisis de incidencia y severidad de acuerdo a cada bioconsorcio evaluado (Bioconsorcio Hongos, Bioconsorcio bacterias, Bioconsorcio mixto)

Reis, I., (1994) define la incidencia como “la proporción de hojas enfermas de la planta en relación a las sanas, dado en porcentaje” (p. 3). Mientras tanto la severidad representa la seriedad/gravedad de la infección en la planta.

El análisis de estas dos variables se realizó en cada zona durante un período de 6 semanas. Debido a que la infección presente en las plantas de *Musa sp.* fue mixta, es decir, provocada por dos agentes *Mycosphaerella spp.* y *Fusarium spp.* este análisis se realizó sin distinción del fitopatógeno causante, es decir, se tomaron en cuenta ambos como una infección mixta, y se obtuvieron los siguientes resultados:

#### **Incidencia de la enfermedad:**

En la primera semana de estudio se observó un mayor grado de incidencia en la zona mixta con un valor de 48.2% de incidencia, seguido de la zona bacterias con 39.5%, seguida de la zona hongos con 14.1 %, y la zona testigo con 13.8%; el porcentaje más bajo. En la segunda semana se observó un aumento de la incidencia en la zona mixta a un 48.5%, seguido de la zona bacterias, la cual

mantuvo su valor en 39.5%, mientras que la zona hongo mantuvo valores bajos de apenas 16.1%, la zona testigo también aumento sus valores a 16.6%.

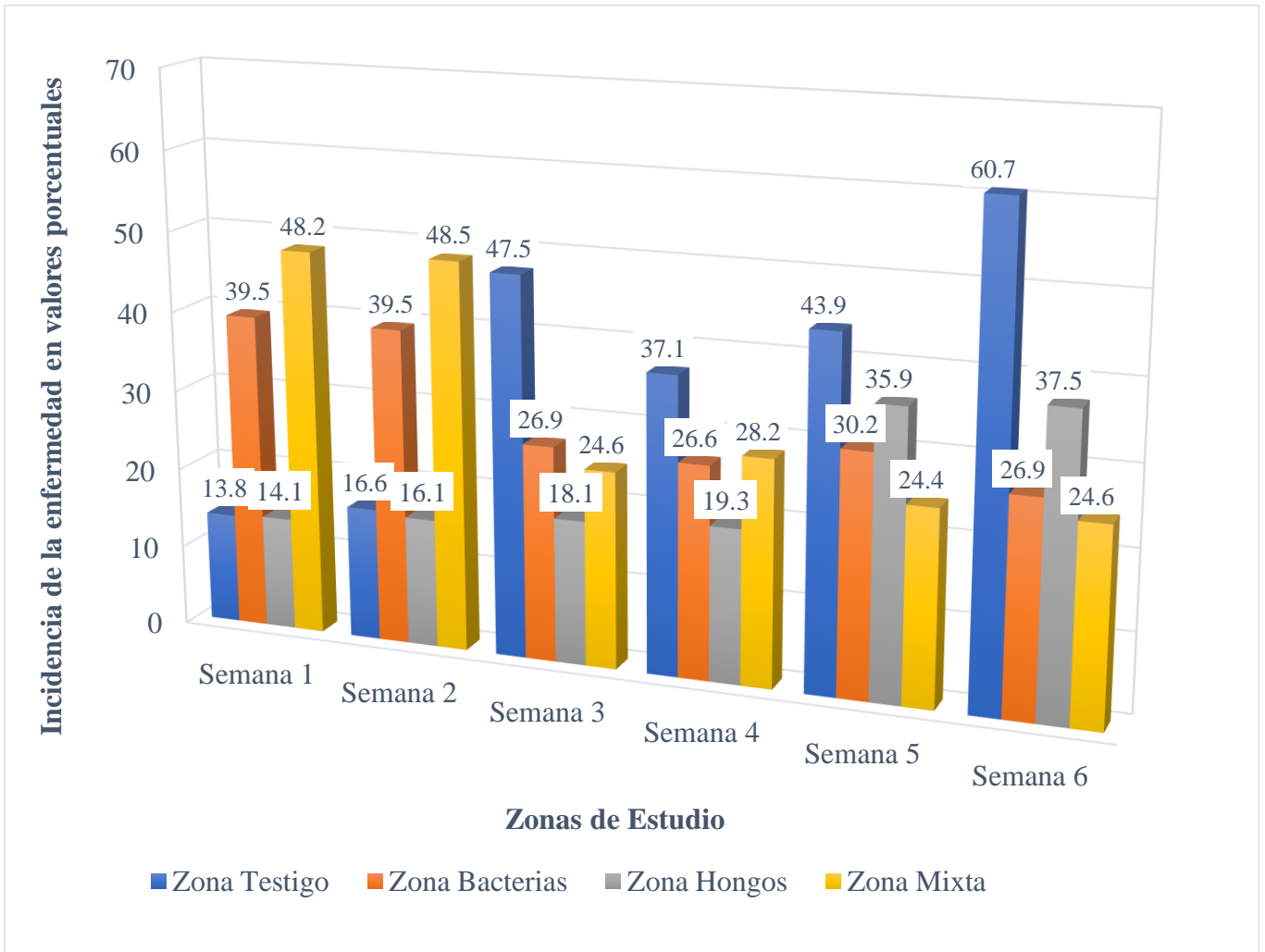
En la tercera semana se comenzaron a observar cambios en la incidencia de la enfermedad, ya que, la zona testigo presentó esta vez los valores más altos, llegando a un 47.5%, un aumento significativo teniendo en cuenta los porcentajes de incidencia de las dos semanas anteriores, por otro lado, las zonas con los bioinsumos aplicados mostraron una disminución gratificante, teniendo la zona bacterias valores de 26.9% seguido de la zona mixta con 25.6% y por último la zona hongos con un 18.1%. En la cuarta semana un hubo cambios alarmantes en la incidencia, la zona bacterias se mantuvo en un valor de 26.6%, superada por la zona mixta con un 28.2% y con valores positivamente menores, la zona hongos, con 19.3%

En la quinta semana hubieron nuevamente grandes aumentos en la incidencia en las 4 zonas; la zona testigo presentó valores de incidencia del 43.9%, la zona bacterias de 30.2%, la zona hongos aumentó llegando al valor más alto hasta la fecha, un 35.9%, por el contrario, la incidencia en la zona mixta decreció a valores de 24.4%, en la sexta y última semana, la zona testigo alcanzó el porcentaje de incidencia más alto en todo el muestreo, llegando a 60.7%, seguida por la zona hongos con un 37.5%, luego la zona bacterias con un 26.9% y la zona mixta con un 24.6%.

Durante las 6 semanas de muestreos, la zona que mostró mejores resultados en la mayor parte del tiempo, fue la zona hongos, la cual hasta la cuarta semana mantuvo valores que no superaron el 19.3% de incidencia, que en comparación con las otras zonas que tenían valores superiores al 20%, sin embargo, en las últimas dos semanas la zona con mejores valores fue la zona mixta con un 24%.



**Grafica 8.** Porcentaje de Incidencia de Sigatoka negra en las plantas de plátano (*Musa sp*) distribuidas en las cuatro zonas de estudio por cada semana de análisis



Fuente: Autores de monografía.

De la zona mixta se observaron los menores resultados de incidencia, en comparación a los demás tratamientos, lo que indica que esta provee un mejor control sobre los fitopatógenos (*Fusarium sp*, y *Mycosphaerella sp*). En cuanto a los bioconsorcios hongos y bacterias, presentaron valores de incidencia mayores a la zona mixta, lo que también representa una respuesta positiva en comparación con los resultados obtenidos por Araúz, M., (2020), en donde “presentan una incidencia de 60.45%” (p. 33). En ambos casos hubo una reducción de la incidencia, sin embargo, en nuestro estudio hubo una disminución superior. Para dicha disminución, también contribuyeron los manejos secundarios de la enfermedad, en este caso el deshoje de la planta.

Al finalizar el análisis, la zona con mayor incidencia de la enfermedad fue la zona testigo. En esta zona no se aplicó ningún bioinsumo, propiciando que los fitopatógenos se desarrollaran plenamente. Inicialmente, esta zona presentaba valores muy bajos, de apenas el 13.8%, valor que aumentó a 60.7% al finalizar la investigación, dicho resultado coincide con los datos de Torrado, M., (2008), el cual presente en su estudio de “incidencia de *Mycosphaerella spp.* valores del 80% de incidencia del fitopatógeno sin la aplicación de tratamiento” (p. 439). A pesar de que los valores de esta investigación no son idénticos al antes mencionado, sigue representando un alto valor de incidencia de la enfermedad.

Con respecto a la zona bacterias y la zona hongos, los valores de incidencia más altos en estos tratamientos fueron de 39.5 % y 37.5% respectivamente, siendo estos resultados, no tan alarmantes, teniendo en cuenta los valores de incidencia de Arauz, M., (2020), en donde “los tratamientos a base de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma sp.*, presentan un porcentaje de incidencia de 68.63 % y 70.90 % respectivamente” (p. 33).

Cabe mencionar que, en su estudio, Arauz, M., presenta problemas climáticos y ambientales que, según la literatura, son factores influyentes en el desarrollo de Sigatoka Negra y por lo tanto el aumento de la incidencia de la enfermedad, este nos dice que: “Este aumento se debió a la presencia de condiciones ambientales favorables debido a la época lluviosa. Las condiciones climáticas que favorecen la incidencia de la sigatoka son periodos de lluvias intensas intercalados con periodos secos, e incrementos graduales de temperatura (23 a 26 °C) y el incremento en la duración de la película de agua en las hojas (siete a 10 h día<sup>-1</sup>) fue muy importante para la germinación de las esporas (p. 20).

### **Severidad de la enfermedad**

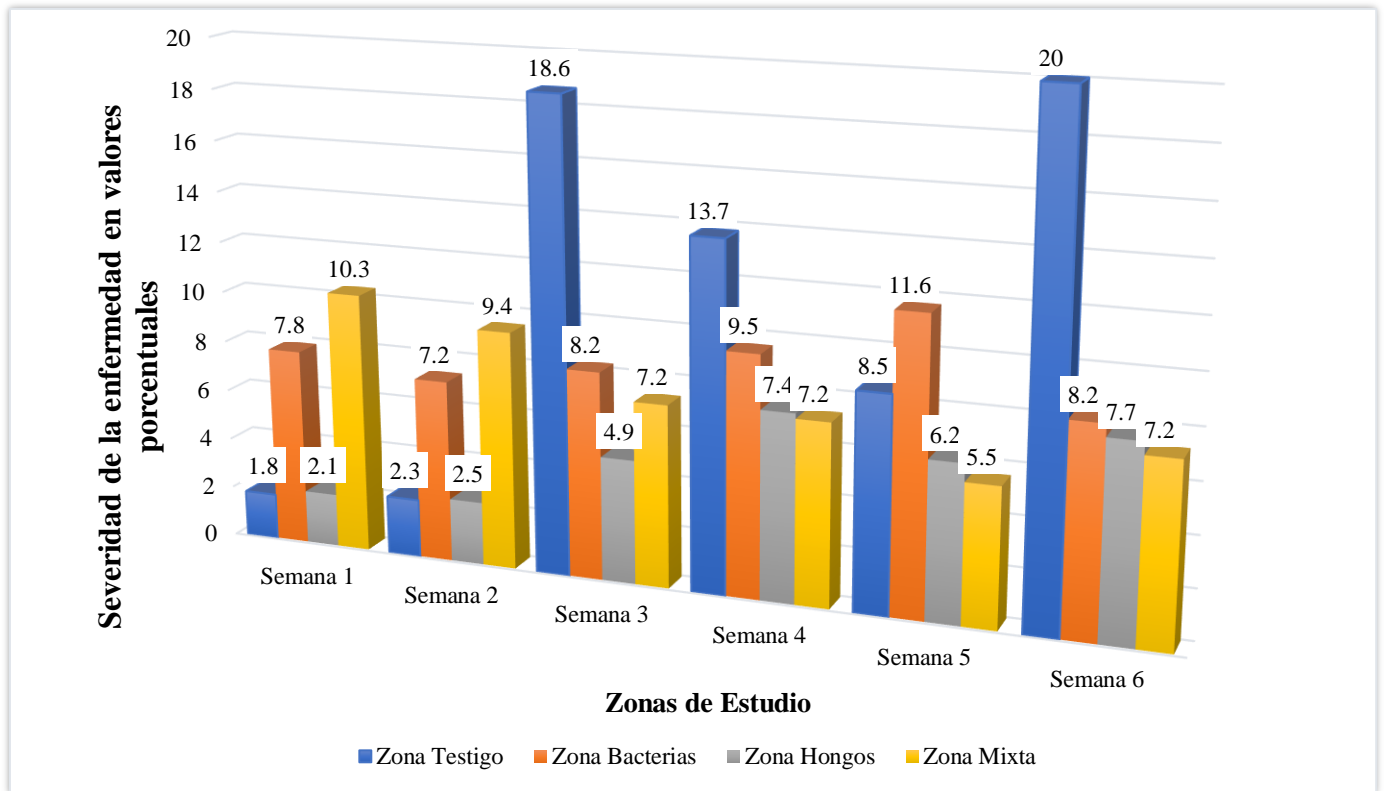
La severidad se realizó tomando en cuenta la gravedad de la enfermedad de acuerdo a la cantidad de síntomas presentes y al porcentaje de incidencia en cada zona. El análisis de severidad se realizó haciendo estudios periódicos durante seis semanas y se obtuvieron los siguientes resultados:

En la primera semana de estudio la zona que presento una mayor severidad fue la mixta, con un valor de 10.3%, seguido de la zona Bacteria con un 7.8%, le sigue la zona hongos con 2.1% y de ultimo la zona testigo con apenas un 1.8%. En la segunda semana la severidad de la enfermedad aumento en las zonas testigo y hongos con valores de 2.3% y 2.5% respectivamente, por otro lado, las zonas Bacterias y Mixtas presentaron una disminución con valores de 7.2% y 9.4% cada una.

En la tercera semana la severidad en la zona testigo aumentó gradualmente hasta alcanzar valores de 18.6%, la zona bacteria aumentó a 8.2%, la zona hongos aumentó a 4.9%, sin embargo, la zona mixta mostró una disminución a 7.2%. En la cuarta semana, la zona que presentó una menor severidad fue la zona mixta con 7.2%, manteniendo su valor anterior, mientras tanto, la zona bacterias y la zona hongos presentaron un aumento, alcanzando valores de 9.5% y 7.4% respectivamente.

En la quinta semana la zona que presentó una mayor severidad fue la zona bacterias con 11.6%, seguido de la zona testigo con 8.5%, luego la zona hongos con 6.2%. La zona que presentó los mejores resultados en la disminución de la severidad fue la zona mixta con 7.2%. En la sexta y última semana, la zona con mayor severidad fue la zona testigo ya que en esta no se aplicó ningún tratamiento biocontrolador. Esta zona alcanzó máximo valor de severidad de todo el estudio, con un 20%, seguido de la zona bacterias con un 8.2%, la zona hongo con un 7.7% y por último la zona mixta con 7.2%.

**Grafica 9.** Severidad de Sigatoka negra en las plantas de plátano distribuidas las 4 zonas por cada semana de análisis.



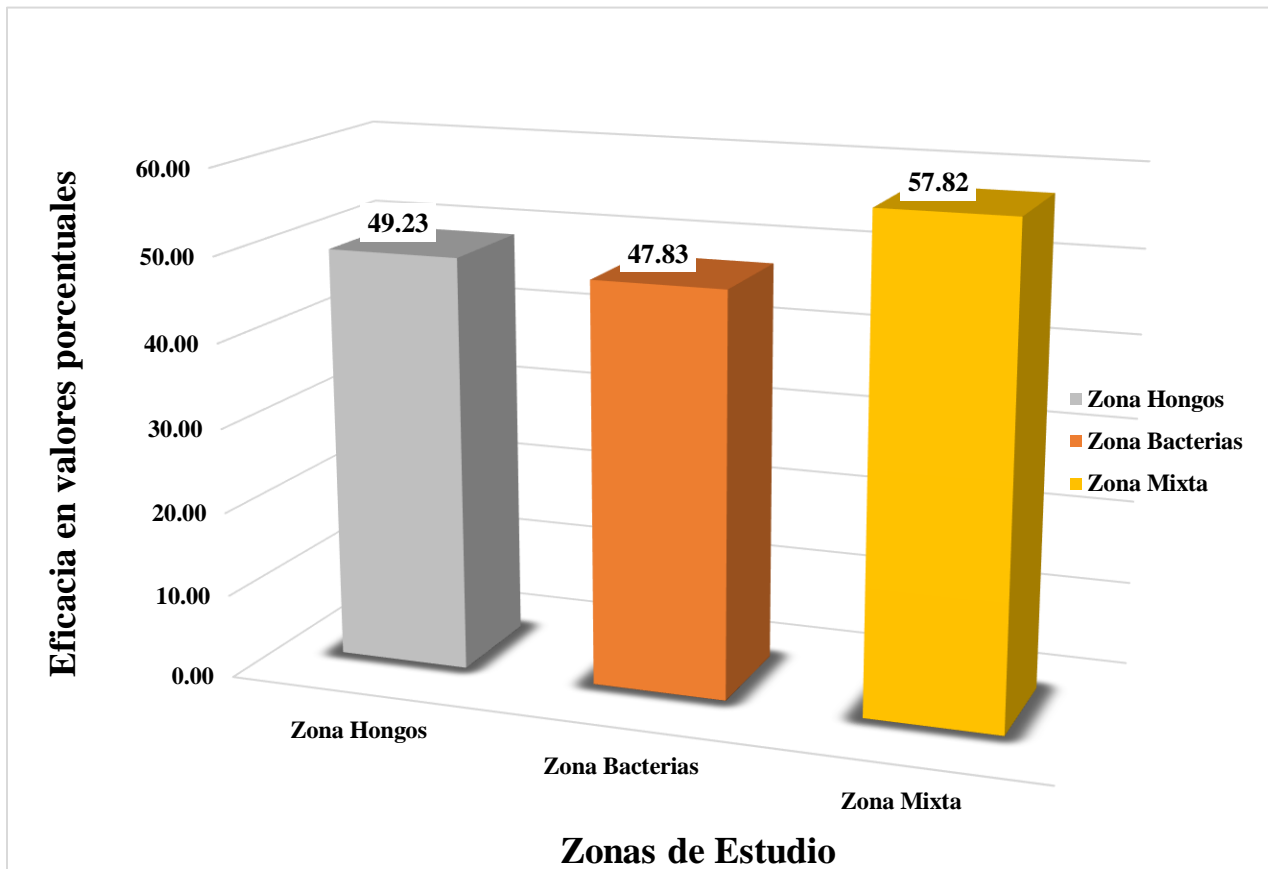
Fuente: Autores de monografía

La zona testigo presentó una mayor severidad con respecto a las demás zonas, este fenómeno se justifica debido a la ausencia de aplicación de bioinsumos, lo que favoreció la producción y desarrollo de los fitopatógenos. Inicialmente, la zona hongos contó con la menor severidad, con apenas 2.1% en la primera semana, sin embargo, este valor aumentó progresivamente hasta alcanzar valores 7.7%, Por otro lado, la severidad en la zona bacterias persistió con valores ente 7% y 11%. Esto demuestra resultados satisfactorios en comparación a la zona testigo. Al finalizar el estudio, la zona mixta presentó los mejores resultados, ya que, en las últimas tres semanas del estudio sus valores permanecieron constantes, demostrando que la presencia de 3 microorganismos benéficos (*Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*), compitiendo con los dos fitopatógenos aislados (*Mycosphaerlla sp* y *Fusarium sp*).

## Eficacia de los bioconsorcios

La eficacia se define como la capacidad de producir un efecto deseado o de realizar un proceso para determinada cosa o acción. Fernández y Sánchez (1997), la definen como la “Capacidad de una organización para lograr los objetivos, incluyendo la eficiencia y factores del entorno” (p. 3). Por ende, la eficacia refiere a la capacidad de resolución de una problemática. Teniendo esto en cuenta, se realizaron los respectivos análisis de eficacia, de donde se obtuvo como resultado que de los tres bioninsumos aplicados en el cultivo de plátano (*Musa spp*), el tratamiento más eficaz para el control de Sigatoka negra fue el bioconsorcio mixto a base de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus Subtilis* y *Bacillus Pumilus* con un porcentaje de 57.82%, seguido de un 49.23% el bioconsorcio hongos, y con un 47.83% el bioconsorcio bacterias.

**Gráfica 10.** Eficacia de bioconsorcios aplicados en tres zonas distribuidas en: zona hongos, zona bacterias y zona mixta.



Fuente: Autores de monografía

Este fenómeno es atribuible a las capacidades de competencia de sustrato y nutrientes de ambos microorganismos que reducen significativamente las poblaciones de *Mycosphaerella spp* y *Fusarium spp*, en un tiempo más reducido a comparación a los demás bioinsumos citados en esta investigación. Según Púrez y Battles (2006) señalan que “*Trichoderma harzianum* muestra una inhibición marcada de la frecuencia y la severidad de marchitez por *Fusarium oxysporum* en *Musa spp*. El biocontrol al momento de la plantación y después de la eliminación de las plantas enfermas brinda un control mayor a 95% en parcelas, previamente destruidas por la enfermedad”

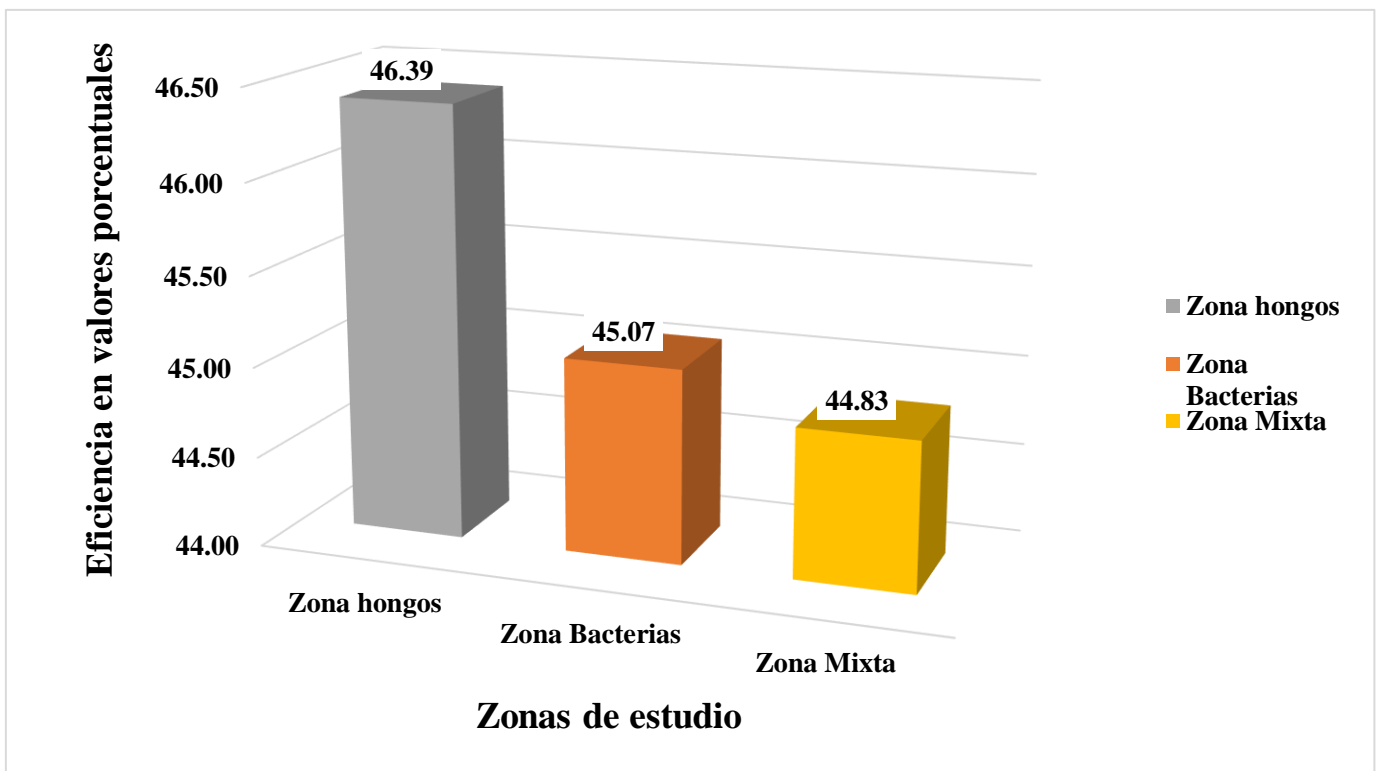
Por otra parte, Layton y Maldonado (2011) agregan que “La síntesis y ensamblaje de polipéptidos antimicrobianos como las iturinas, fengicinas y gramicidinas requieren de la expresión de varios genes codificados en el genoma bacteriano que intervienen en su formación, principalmente de tipo sintetetasas. La presencia de estos genes asociados en cepas de *Bacillus spp*, es un factor determinante para establecer si la antibiosis es el mecanismo de acción que induce muerte al fitopatógeno, teniendo en cuenta que es el utilizado por la mayoría de las cepas.”

### Eficiencia de los bioconsorcios

La eficiencia hace énfasis en los medios para resolver un problema, de cumplir tareas y obligaciones, de ir del pasado al presente; Fernández y Sánchez (1997), lo definen como “una expresión o cualidad de la actuación de un sistema o sujeto económico para lograr con el cumplimiento de objetivos determinados, minimizando así el empleo de recursos.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, se realizaron los respectivos análisis de eficiencia, donde se obtuvo que el bioinsumo con mayor porcentaje de eficiencia fue el aplicado en la zona hongos (46.39%), seguido del bioinsumo a base de bacterias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*) con un 45.0% y por último el bioinsumo aplicado en la zona delimitada para una aplicación mixta (hongos y bacterias) con un 44.83%.

**Gráfica 11.** Eficiencia de bioconsorcios aplicados en 3 zonas distribuidas en: zona hongos, zona bacterias y zona mixta



Fuente: Autores de monografía

A pesar que los tres bioconsorcios suponen una alternativa con una eficiencia similar, el bioconsorcio hongos, es la alternativa más eficiente, esto es atribuible a los mecanismos de acción de competencia, micoparasitismo que consiste en una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno. De igual forma el mecanismo de antibiosis juega un papel fundamental en la reducción poblacional del fitopatógeno, mediante la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos. Estos datos; en contraste con los de Tórres y Cabrera (2018), cuyos resultados arrojan una eficiencia que oscila entre los 60% y 70%, en el manejo de 3 enfermedades fúngicas foliares del arroz, de lo que se infiere que, en condiciones similares, se pueden obtener resultados igual de alentadores.



## 8. CONCLUSIONES

1. A pesar de que *Mycosphaerella sp.* es el principal patógeno de los cultivos de *Musa spp*, existen otros microorganismos que pueden producir síntomas similares a la sigatoka negra; en ocasiones, puede presentarse como una infección mixta, como lo fue en este caso, donde se lograron aislar dos fitopatógenos, *Mycosphaerella sp* (80%) y *Fusarium sp.* (20%).
2. Los bioconsorcios son herramientas útiles para controlar plagas en cultivos, esto se demostró en las pruebas in vitro, donde se observa que *Trichoderma harzianum* es más competitivo (por sustrato y espacio) en comparación al crecimiento de los dos fitopatógenos encontrados, pues el porcentaje de inhibición de *Fusarium sp* en presencia de *Trichoderma harzianum* es de 61.4 % y de 80.9% en lo que respecta a *Mycosphaerella sp* en presencia de *T. harzianum*.
3. En cuanto a la eficiencia, el tratamiento que presento mejores resultados fue el aplicado en la zona hongos (a base de *Trichoderma harzianum*), con un 79.06 %, siendo el mayor dato recolectado durante las 6 semanas de análisis, concluyéndose también, que en este resultado existieron otros variables intervinientes no analizadas como la humedad y el nivel de exposición solar de esta zona en específico.
4. Finalmente, se concluyó que tratamiento con mayor eficacia para el control de Sigatoka negra fue el bioconsorcio mixto a base de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus Subtilis* y *Bacillus Pumilus* con un porcentaje de 57.82%.

## **9. RECOMENDACIONES**

### **A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-Managua)**

Enfocar un mayor interés a la línea de estudio e investigación de biotecnología dentro de la carrera de Microbiología, haciendo énfasis en el estudio de otros fitopatógenos en el área agroindustrial dentro del país.

### **A los estudiantes**

Se recomienda la continua investigación de las pruebas de antagonismo utilizando *Mycosphaerella spp*, ya que no existen muchos antecedentes en lo que respecta a los porcentajes de inhibición y tasas de crecimiento de este fitopatógeno.

Por otro lado, se recomienda implementar estudios moleculares como parte de la identificación de fitopatógenos, ya que la incorporación de estas herramientas representa una gran ventaja por encima de los métodos de identificación convencional.

### **A los pequeños, medianos y grandes productores**

Fortalecer y promover la implementación y uso de bioinsumos para el tratamiento de plagas en zonas de cultivos, ya estos no son nocivos con el medio ambiente, plantas o el ser humano. Además de estudiar la compatibilidad con otros microorganismos autóctonos para aumentar el espectro de control sobre otros patógenos.

### **A Biotechnica S.A**

Seguir apoyando la realización de futuros ensayos de estudio dentro del área de biotecnología, el antagonismo entre microorganismos y su capacidad como biocontroladores para el mejoramiento de los productos usados al tratar plantaciones agrícolas.

## 10. RERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

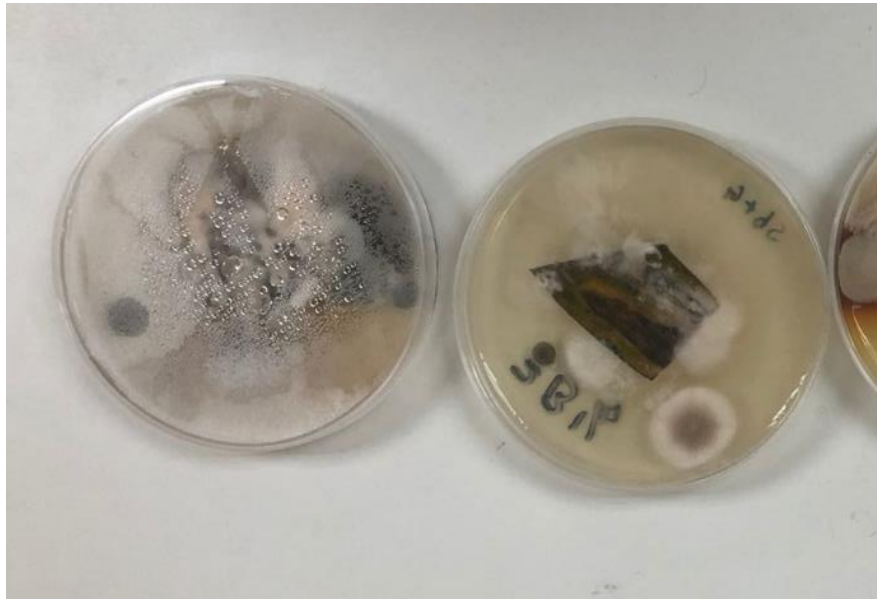
- Anja Petersohn, M. B. (2001). Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *Journal Of Bacteriology*, 15.
- Beer, Z. d. (2001). Enfermedad del falso mal de Panamá. *inibap*, 3-6.
- Bennet, R. (2005). Sigatoka negra, bananeros y plataneros. *APS*, 22.
- Buzoianu C., M. C. (2012). Análisis secuencial de alto rendimiento de la microbiota intestinal de cerdos destetados alimentados con maíz MON810 modificado genéticamente que expresa *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab (maíz Bt) durante 31 días. *American Society for microbiology*, 8.
- Castaño, J. (2011). *Prácticas de laboratorio de fitopatología*. Tegucigalpa: Zamorano.
- Cercenado, E. (2010). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades, Procedimientos de microbiología clínica. *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*, 2-3.
- Céspedes, A. V. (12 de Diciembre de 2017). *Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en el cultivo de banano en Costa Rica*. Obtenido de Ficha técnica cultivo de Banano: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/reduccionimpacto-por-eventos-climaticos/Informe-final-Banano.pdf>
- Cruz, M. (2015). Efecto de bacteria promotora del crecimiento vegetal *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 sobre plantas de 'Grande naine' (*Musa AAA*) en fase de aclimatización. *Biotecnología vegetal* , 3-6.
- Fouré, E. (1994). *The Improvement and testing of musa: a global partnership*. Tegucigalpa: DR Jones.
- Gauhl, F. (1994). *Epidemiology and ecology of black Sigatoka (Mycosphaerella sp. Morelet) on plantain and banana (Musa spp.) in Costa Rica, Central America*. Montpellier: MusaLit.
- Hashem, A. (2019). *Bacillus subtilis* : una rizobacteria promotora del crecimiento de las plantas que también afecta el estrés biótico. *Revista Saudita de Ciencias Biológicas.*, 6-7.

- Horta, H. d. (2009). *Estudio Del Ciclo De Vida De Mycosphaerella Sp. En Tres Regiones De La Zona Bananera Del Magdalena*. Palmira: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
- IntagriS.C. (2014). Trichoderma Control de Hongos Fitopatógenos. *Fitosanidad*, 6-7.
- Koneman, E. W. (2008). *Diagnóstico microbiológico*. México: Editorial Panamericana.
- Manzo-Sánchez., G. (2004). Biología de *Mycosphaerella sp.* Morelet y su Interacción con *Musa spp.* *Revista Mexicana de Fitopatología*, 87-89.
- Marin, D. (15 de Enero de 2003). *ResearchGate*. Obtenido de Sigatoka negra: una amenaza cada vez mayor para el cultivo del banano:  
file:///C:/Users/Vaughan/Downloads/PDIS.2003.87.3.208%20(1).pdf
- Matute, J. C. (2004). *Manual de procedimientos de Bacteriología Médica*. Managua: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.
- Mejía, J. (2004). *Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica*. Managua : Litografía Nicaraguense.
- Mourichon, X. (13 de Octubre de 1997). *Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano*. Obtenido de Enfermedades de Sigatoka :  
[https://agritrop.cirad.fr/314356/7/314356\\_ES.pdf](https://agritrop.cirad.fr/314356/7/314356_ES.pdf)
- Noruega Ortega, E. S. (2016). Uso de la bacteria bacillus subtilis como agente de control biológico de hongos fitopatógenos en cultivos tropicales. *Utmach*, 43.
- Pedraza, L. A. (2019). Mecanismos de acción de Bacillus spp. (Bacillaceae). *Acta biológica Colombiana* , 15-18.
- Pérez, A. (2017). Actividades De Biocontrol De Trichoderma. En *FarmaJournal*, vol. 2, núm. 1 (págs. 90-93). Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca.
- Pérez, V. (2002). *Mycosphaerella musicola*. *Fichas técnicas de la dirección nacional de Sanidad vegetal*, 7-9.
- Polanco, T. (2009). *Patógenos asociados a las musáceas en la República Dominicana*. Santo Domingo: Editorial del Instituto Dominicano de investigaciones agropecuarias y forestals (IDIAF).

- Seija, V. (2002). COCOS GRAM POSITIVOS: Aspectos prácticos. *Higiene y Educación*, 1-5.
- Shoda, M. (2019). *Biocontrol of Plant Diseases by Bacillus Subtilis*. Boca Raton: Taylor & Francis Group .
- SENASICA. (2018). *Detección e identificación de hongos fitopatógenos a partir de semillas*. Tecamac: Editorial SENASICA.
- Usán, Y. C. (2012). *Manual de Prácticas de Ingeniería Agrícola*. Cuautitlán: Editorial Es FESC.
- Veroy, K. (12 de abril de 2013). *Academia Edu*. Obtenido de Fundamentos de pruebas bioquímicas: [https://www.academia.edu/14523152/Fundamentos\\_De\\_Pruebas\\_Bioquimicas](https://www.academia.edu/14523152/Fundamentos_De_Pruebas_Bioquimicas)
- Vicente, L. P. (2002). Morfología De Las Especies De Mycosphaerella Asociadas A Manchas De Las Hojas De Musa Sp. *Fitosanidad*, 8.
- Vinchira-Villagra, D. M. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Colombia biotecnología* , 4-5.
- Washington Winn, S. A. (2006). *Koneman, diagnostico microbiologico*. Mexico D.F.: Panamericana .
- Watss, F. (2015). Podredumbre de raíces . *SENASICA*, 18.
- Whelan, A. (11 de Marzo de 2013). *Ministerio de agricultura ganadería y pesca*. Obtenido de Bioinsumos: Un giro hacia la sustentabilidad: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=200#:~:text=E1%20t%C3%A9rmino%20E2%80%9Cbioinsumos%E2%80%9D%20alude%20a,e1%20desarrollo%20de%20las%20plantas>.
- YihuiYuan. (2015). Análisis genómico de un jengibre. *Scientific Reports*, 3-5.

# **11. ANEXOS**

Anexo 1. Identificación de *Mycosphaerella* en parcelas de cultivo de plátano (*Musa* spp)



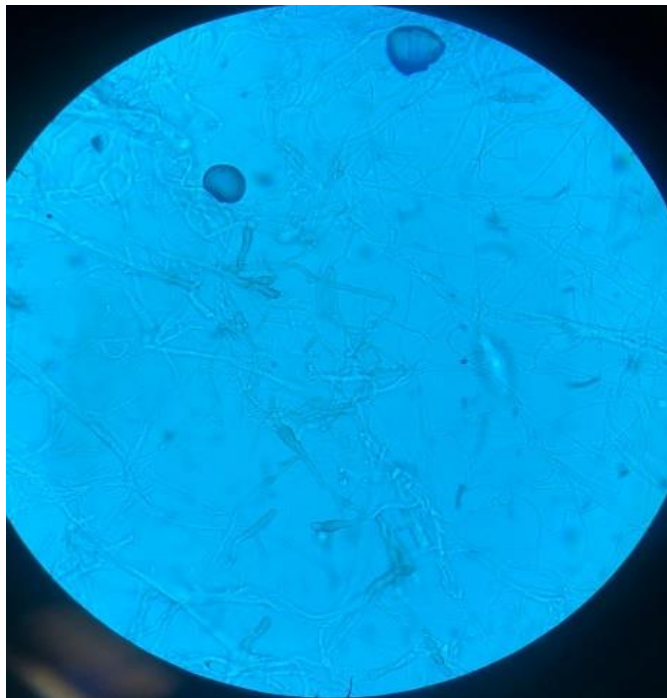
**Imagen. 1** inoculación directa de tejido foliar sintomatológico en Agar Sabouraud + gentamicina al 0.1%



**Imagen. 2:** Crecimiento sobre tejido foliar sintomatológico incubado bajo el método de cámara húmeda

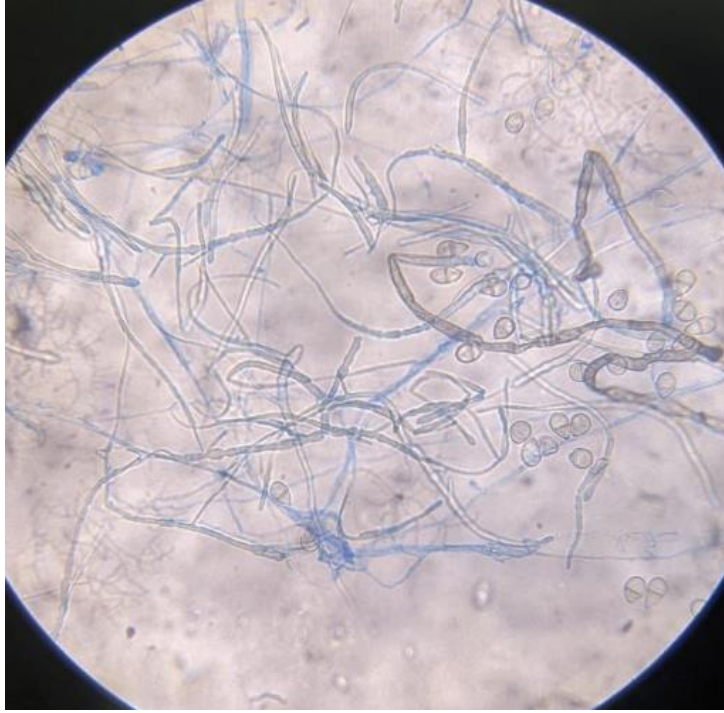


**Imagen. 3:** Diferenciación de colonias a partir de inoculación directa de tejido foliar sintomatológico.



**Imagen. 4:** Visualización de estructuras micóticas en azul de lactofenol.



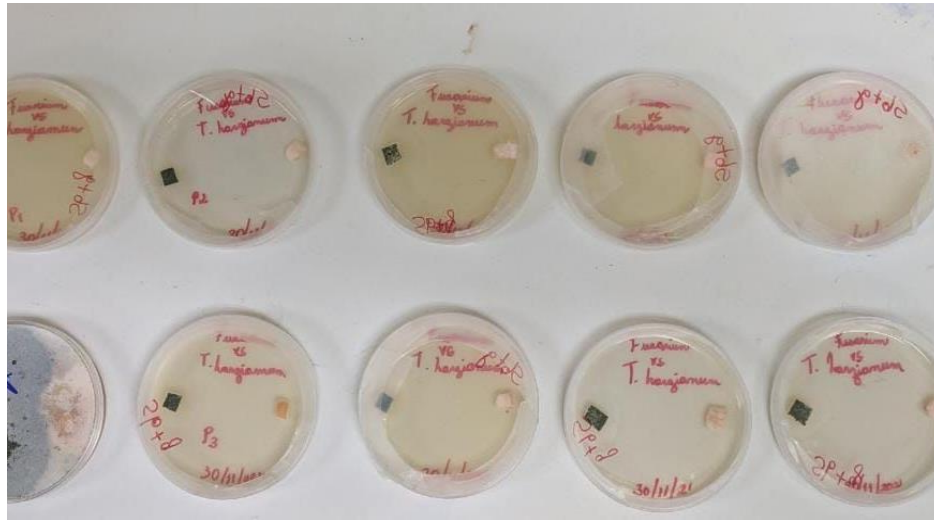


**Imagen. 5:** Visualización de pseudocercosporas de *Mycosphaerella* a por microscopía convencional 40X con tinción de azul de lactofenol



**Imagen. 6:** Crecimiento de estructuras micológicas (*fusarium sp*) a partir de tejido foliar sintomatológico, halo de inhibición mediado por *Bacillus sp* , en agar TSA , muestra de Zona Bacteria

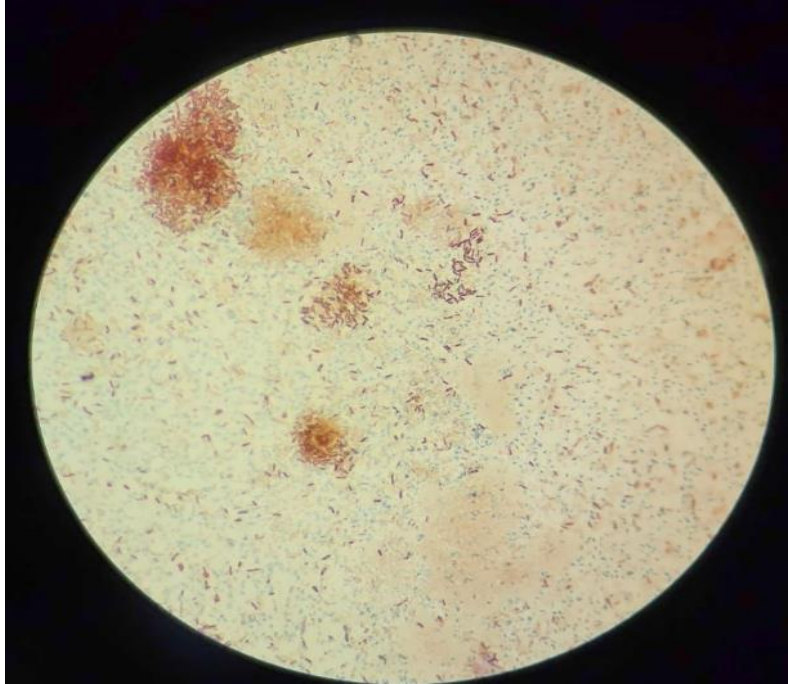
## Anexo 2. Comparación in vitro de la capacidad antagonista



**Imagen 7.** Montaje de pruebas de antagonismo.



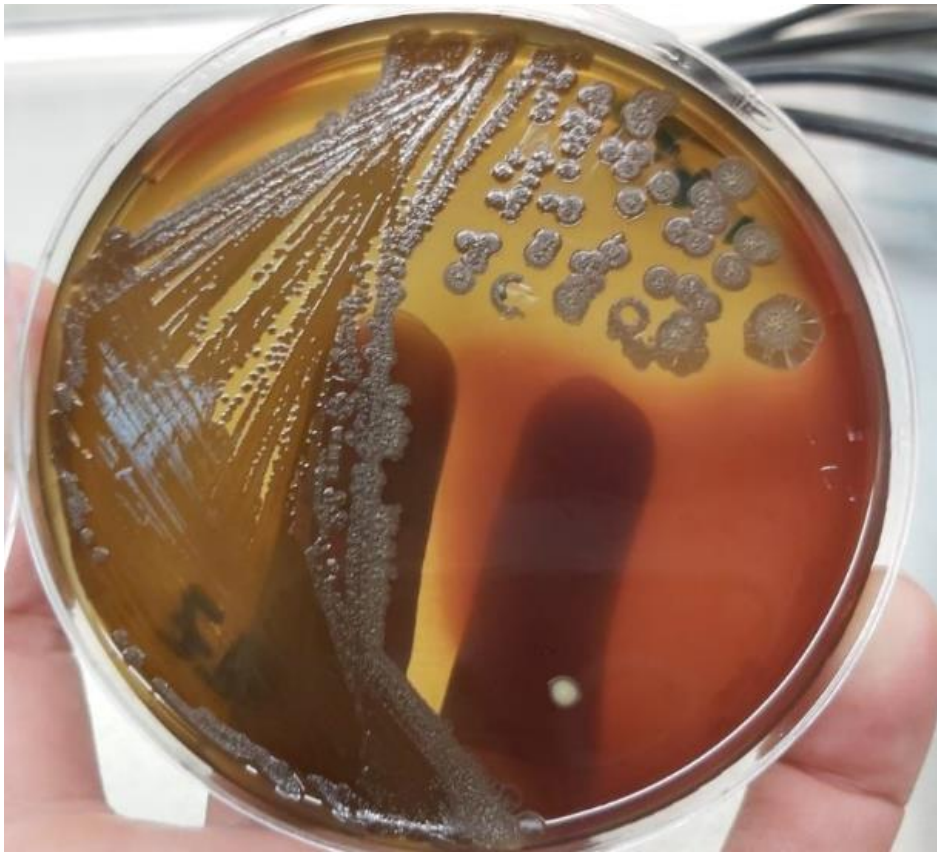
**Imagen 8.** Selección de aislamientos antagonistas. Cepa control de *Trichoderma harzianum* provista por Biotechnica S.A, para montaje de pruebas de antagonismo



**Imagen 9.** Tinción de Gram a partir de cultivo de *Bacillus sp* en TSA



**Imagen 10.** *Bacillus sp* cultivado en agar sangre de carnero al 5%

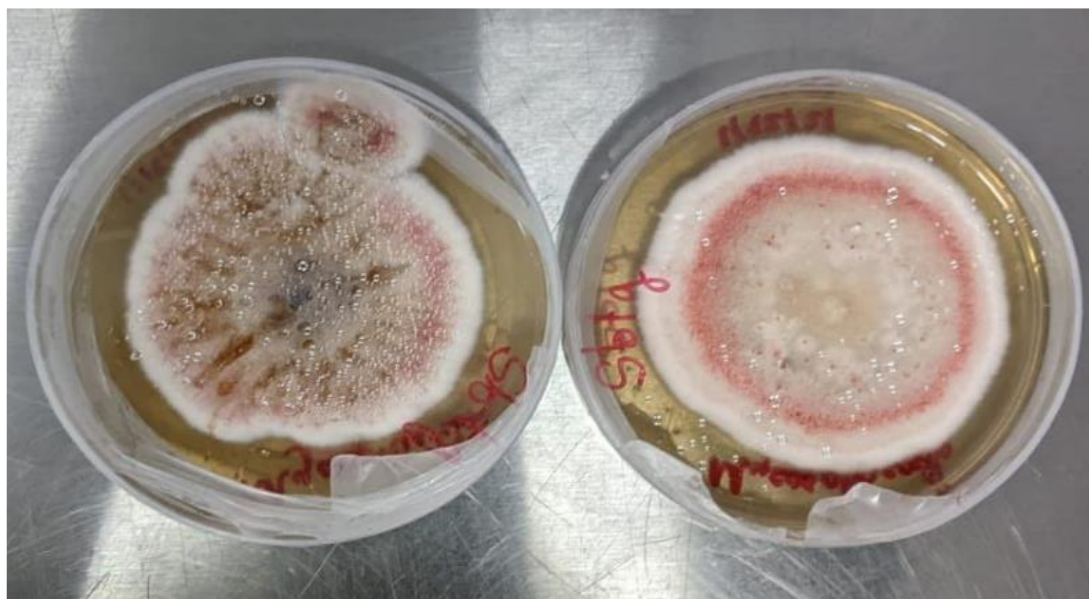


**Imagen 11.** *Bacillus sp* cultivado en agar sangre de carnero al 5%

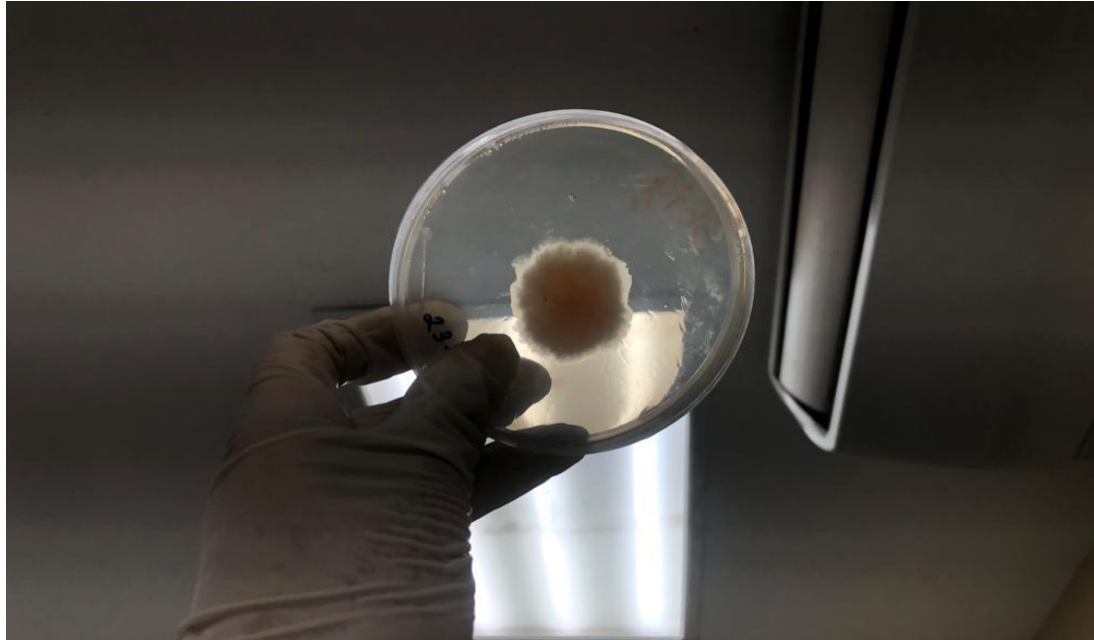
Tabla 1. Batería bioquímica de identificación de *Bacillus spp*

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b><i>Bacillus spp</i></b>	<b>Reacción obtenida</b>
Lecitinasa	+ (80%)	-
Crecimiento en Agar Sangre 5%	+	+
BETA-Hemólisis	+ (80%)	Beta-hemólisis (+)
Catalasa	+	+
TSI	K/K (62.5%) K/A (37.5%)	K/A
Movilidad	+	+
Arginina	-	-
Voges Proskauer	+ (90%)	-

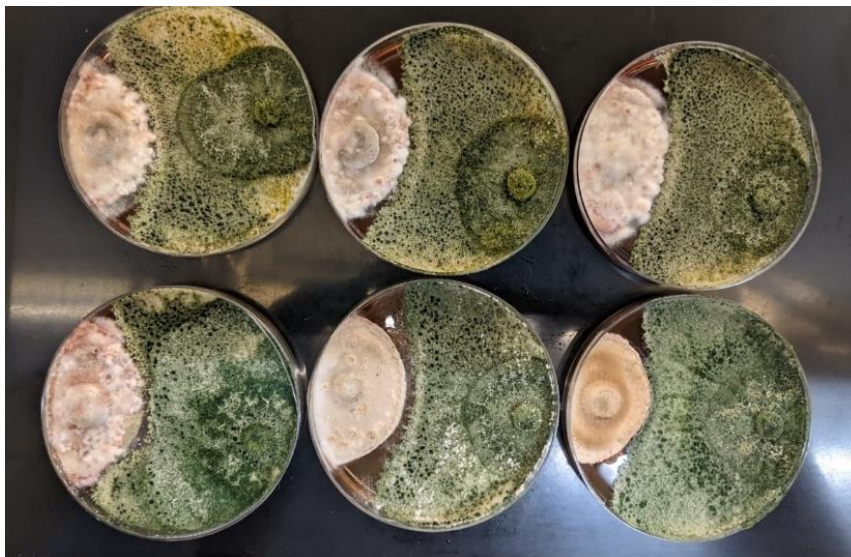
Urea de Christensen	+ (43%); - (43%); Indeterminada (14%)	-
Glucosa	+	+
L-arabinosa	+ (14%); - (86%)	-
D-xilosa	+ (14%); - (86%)	-
D-Manitol	+ (70%)	-
Sacarosa	+ (53%)	-
Maltosa	+ (70%)	-
Lactosa	+ (53%)	-
Utilización del Citrato	+ (43%); - (43%); Indeterminada (14%)	+
Reducción de Nitrato	+ (90%)	-



**Imagen 12.** Selección de fitopatógeno (cultivo axénico de *Mycosphaerella sp*) para montaje de pruebas de antagonismo.



**Imagen 13.** Selección de fitopatógeno (Cultivo axénico de *Fusarium spp* con 3 días de incubación)



**Imagen 14.** Pruebas de antagonismo enfrentando *Mycosphaerella sp* versus *Trichoderma harzianum*



**Imagen 15.** Prueba de antagonismo enfrentando *Mycosphaerella sp* versus *Trichoderma harzianum*



**Imagen 16.** Prueba de antagonismo enfrentando *Fusarium sp* versus *Trichoderma harzianum*

Pruebas de Antagonismo					
Cantidad de cultivos de fitopatógeno		Género y especie*		Fecha de montaje	Número y fecha de Lectura
2		<i>Fusarium spp</i>		30 de Noviembre de 2021	Lectura 2- 02/12/2021
Código de placa	Temperatura	Contaminantes*	Observaciones		
Placa 1	26°	Sin contaminación	Sin observaciones		
Placa 2	26°	Sin contaminación	Sin observaciones		
		Sin contaminación	Sin observaciones		
		Sin contaminación	Sin observaciones		
		Sin contaminación	Sin observaciones		
Cantidad de cultivos de biocontrolador		Género y Especie*		Fecha de montaje	Número y fecha de Lectura
2		<i>Trichoderma harziuanum</i>		30 de Novimebre de 2021	Lectura 2-02/12/2021
Código de placa	Temperatura	Contaminantes*	Observaciones		
Placa 1	26°	Sin contaminación	Sin observaciones		
Placa 2	26°	Sin contaminación	Sin observaciones		
		Sin contaminación	Sin observaciones		
		Sin contaminación	Sin observaciones		
		Sin contaminación	Sin observaciones		
Microorganismos enfrentados					
Géneros y especies*	Fecha de montaje	Código de placa	Contaminación*	Avance //crecimiento de biocontrolador (mm)	Avance// crecimiento fitopatógeno (mm)
<i>Trichoderma harzianum vs fusarium spp</i>	30 de noviembre de 202	P1	Sin contaminación	45mm	10
<i>Trichoderma harzianum vs fusarium spp</i>	30 de noviembre de 202	P2	Sin contaminación	43mm	15
<i>Trichoderma harzianum vs fusarium spp</i>	30 de noviembre de 202	P3	Sin contaminación	48mm	13
<i>Trichoderma harzianum vs fusarium spp</i>	30 de noviembre de 202	P4	Sin contaminación	44mm	15



<i>Trichoderma harzianum vs fusarium spp</i>	30 de noviembre de 2021	P5	Sin contaminación	45mm	18
<i>Trichoderma harzianum vs fusarium spp</i>	30 de noviembre de 2021	P6	Sin contaminación	45mm	16
<i>Trichoderma harzianum vs fusarium spp</i>	30 de noviembre de 2021	P7	Sin contaminación	35mm	10
<i>Trichoderma harzianum vs fusarium spp</i>	30 de noviembre de 2021	P8	Sin contaminación	50mm	24
<i>Trichoderma harzianum vs fusarium spp</i>	30 de noviembre de 2021	P9	Sin contaminación	45mm	15

**Tabla 2.** Formato de lectura de prueba de antagonismo enfrentando *Trichoderma harzianum* vs *Fusarium sp* elaborado por autores de monografía

Pruebas de Antagonismo					
Cantidad de cultivos de fitopatógeno	Género y especie*		Fecha de montaje	Número y fecha de Lectura	
2	<i>Mycosphaerella sp</i>		01 de Diciembre de 2021	Lectura 2- 03/12/2021	
Código de placa	Temperatura	Contaminantes*	Observaciones		
P1	26°	Sin contaminación	Sin observaciones		
P2	26°	Sin contaminación	Sin observaciones		
Cantidad de cultivos de biocontrolador	Género y Especie*		Fecha de montaje	Número y fecha de Lectura	
2	<i>Trichoderma harziuanum</i>		01 de Diciembre	Lectura 2- 03/12/2021	
Código de placa	Temperatura	Contaminantes*	Observaciones		
P1	26°	Sin contaminación	Sin observaciones		
P2	26°	Sin contaminación	Sin observaciones		
Microorganismos enfrentados					
Géneros y especies*	Fecha de montaje	Código de placa	Contaminación*	Avance //crecimiento de	Avance// crecimiento fitopatógeno (mm)

				biocontrolador (mm)	
<i>Trichoderma harzianum vs Mycosphaerella</i>	01 de Diciembre de 2021	P1	Sin contaminación	23	12
<i>Trichoderma harzianum vs Mycosphaerella</i>	01 de Diciembre de 2021	P2	Sin contaminación	21	15
<i>Trichoderma harzianum vs Mycosphaerella</i>	1 de Diciembre de 2021	P3	Sin contaminación	30	13
<i>Trichoderma harzianum vs Mycosphaerella</i>	1 de Diciembre de 2021	P4	Sin contaminación	24	14
<i>Trichoderma harzianum vs Mycosphaerella</i>	1 de Diciembre de 2021	P5	Sin contaminación	22	15
<i>Trichoderma harzianum vs Mycosphaerella</i>	1 de Diciembre de 2021	P6	Sin contaminación	23	16
<i>Trichoderma harzianum vs Mycosphaerella</i>	1 de Diciembre de 2021	P7	Sin contaminación	22	14

Tabla 3. Formato de lectura de prueba de antagonismo enfrentando *Trichoderma harzianum* vs *Fusarium sp* elaborado por autores de monografía

Lectura 1			Lectura 2			Lectura 3		
Códigos	<i>Fusarium sp</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Códigos	<i>Fusarium sp</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Códigos	<i>Fusarium sp</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>T.h control</i>	-	26	<i>T.h control</i>	-	60	<i>T.h control</i>	-	60
<i>Fus control</i>	16	-	<i>Fus control</i>	40	-	<i>Fus control</i>	55	-
P1	6	25	Placa 1	11	28	Placa 1	10	45
P2	6	21	Placa 2	11	30	Placa 2	15	43

P3	6	30	Placa 3	15	33	Placa 3	13	48
P4	6	20	Placa 4	20	36	Placa 4	15	44
P5	6	24	Placa 5	15	35	Placa 5	16	45
P6	6	30	Placa 6	15	45	Placa 6	10	45
P7	6	20	Placa 7	11	25	Placa 7	24	35
P8	6	20	Placa 8	10	44	Placa 8	15	50
P9	6	23	Placa 9	10	46	Placa 9	15	45
Promedio	6	23.7	Promedio	13.1	35.8	Promedio	14.8	44.4

Fus: *Fusarium sp.* T.h: *Trichoderma harzianum* ;

Fuente: Autores de Monografía

**Tabla 4.** Lectura de prueba de antagonism enfrentando *Fusarium sp* versus *Trichoderma harzianum*

Códigos	<i>Mycosphaerella</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Códigos	<i>Mycosphaerella</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Códigos	<i>Mycosphaerella</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>T.h</i> control	0	30	<i>T.h</i> control	0	57	<i>T.h</i> control	0	60
<i>Mycos</i> control	11	0	<i>Mycos</i> control	34	0	<i>Mycos</i> control	55	0
P1	10	20	Placa 1	12	23	Placa 1	13	43
P2	11	19	Placa 2	15	21	Placa 2	16	44
P3	11	17	Placa 3	13	30	Placa 3	14	45
P4	11	20	Placa 4	14	24	Placa 4	15	49
P5	11	17	Placa 5	15	22	Placa 5	15	50
P6	12	20	Placa 6	16	23	Placa 6	18	46
P7	12	20	Placa 7	14	22	Placa 7	15	48
Promedio	11	19	Promedio	14.1	24	Promedio	15	46

*Mycos*: *Mycosphaerella sp.*

Fuente: Autores de Monografía

**Tabla 5.** Lecturas de pruebas de antagonismo enfrentando *Mycosphaerella sp* versus *Trichoderma harzianum*

### Anexo 3. Valoración de la eficiencia y eficacia



**Imagen 17.** Cultivo de plátano (*Musa sp*) en la comarca las viudas, en la ciudad de Managua



**Imagen 18.** Delimitación de las 4 zonas de estudio, e imagen satelital del área de análisis

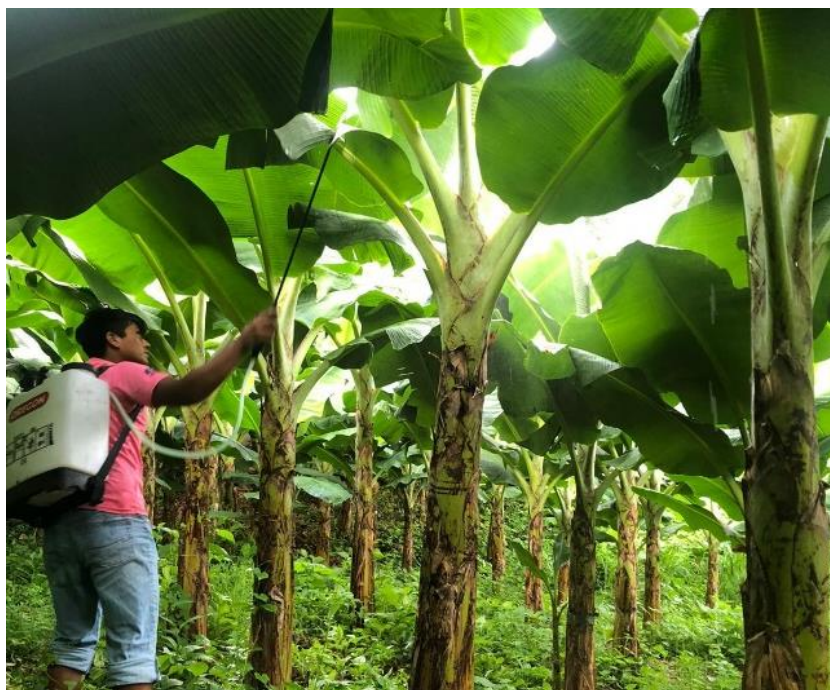
Zona Testigo															
Numero	Codigo de la Planta	Síntomas según gravedad de la enfermedad							Hojas sin síntomas	Hojas con síntomas	Total de hojas	Incidencia	% de daño	Severidad	
		Severidad baja		Severidad media			Severidad alta								Severidad e incidencia
		14%	28%	42%	56%	70%	84%	98%							
1. Pisca	2. Raya	3. Estria	4. Mancha	5. Mancha clorotica	6. Mancha grisácea	7. Hoja muerta									

1	ZTF1P1			x				6	1	7	14.3	12.5	1.8
2	ZTF1P2			x				6	1	7	14.3	12.5	1.8
3	ZTF1P3			x				5	2	7	28.6	12.5	3.6
4	ZTF1P4		x					6	2	8	25.0	12.5	3.1
5	ZTF1P5				x			7	1	8	12.5	12.5	1.6
6	ZTF1P6	Planta Sana						8	0	8	0.0	0	0.0
7	ZTF1P7				x			7	1	8	12.5	12.5	1.6
8	ZTF1P8					x		7	2	9	22.2	12.5	2.8
9	ZTF1P9			x				7	0	7	0.0	12.5	0.0
10	ZTF1P10					x		7	2	9	22.2	12.5	2.8
11	ZTF1P11							7	0	7	0.0	0	0.0
12	ZTF1P12				x			7	0	7	0.0	12.5	0.0
13	ZTF1P13				x			8	2	10	20.0	12.5	2.5
14	ZTF2P1		x					8	1	9	11.1	12.5	1.4
15	ZTF2P2	Planta Sana						7	1	8	12.5	0	0.0
16	ZTF2P3		x					9	2	11	18.2	12.5	2.3
17	ZTF2P4	planta sana						9	1	10	10.0	0	0.0
18	ZTF2P5						x	9	0	9	0.0	12.5	0.0
19	ZTF2P6	planta sana						9	1	10	10.0	0	0.0
20	ZTF2P7		x					7	2	9	22.2	12.5	2.8
21	ZTF2P8	planta sana						7	1	8	12.5	0	0.0
22	ZTF2P9		x					7	2	9	22.2	12.5	2.8
23	ZTF2P10	planta sana						7	2	9	22.2	0	0.0
24	ZTF2P11						x	7	0	7	0.0	12.5	0.0
25	ZTF2P12	planta sana						9	0	9	0.0	0	0.0
26	ZTF3P1		x					8	2	10	20.0	12.5	2.5
27	ZTF3P2						x	6	1	7	14.3	12.5	1.8
28	ZTF3P3						x	8	1	9	11.1	12.5	1.4

29	ZTF3P4		x	x					7	2	9	22.2	25	5.6
30	ZTF3P5		x						7	0	7	0.0	12.5	0.0
31	ZTF3P6		x						6	1	7	14.3	12.5	1.8
32	ZTF3P7						x		6	1	7	14.3	12.5	1.8
33	ZTF3P8	Planta sana							5	0	5	0.0	0	0.0
34	ZTF3P9	Planta sana							5	0	5	0.0	0	0.0
35	ZTF3P10	planta Sana							6	1	7	14.3	0	0.0
36	ZTF3P11		x						9	0	9	0.0	12.5	0.0
37	ZTF3P12						x		7	2	9	22.2	12.5	2.8
38	ZTF3P13		x						7	0	7	0.0	12.5	0.0
39	ZTF3P14			x					6	1	7	14.3	12.5	1.8
40	ZTF4P1		x						6	1	7	14.3	12.5	1.8
41	ZTF4P2	Planta sana							5	0	5	0.0	0	0.0
42	ZTF4P3		x						5	1	6	16.7	12.5	2.1
43	ZTF4P4	Planta Sana							5	1	6	16.7	0	0.0
44	ZTF4P5		x						6	1	7	14.3	12.5	1.8
45	ZTF4P6			x					6	1	7	14.3	12.5	1.8
46	ZTF4P7		x	x	x				7	2	9	22.2	37.5	8.3
47	ZTF4P8		x						7	1	8	12.5	12.5	1.6
48	ZTF4P9		x	x	x				6	1	7	14.3	37.5	5.4
49	ZTF4P10		x						7	1	8	12.5	12.5	1.6
50	ZTF4P11						x		6	1	7	14.3	12.5	1.8
51	ZTF4P12		x						7	2	9	22.2	12.5	2.8
52	ZTF4P13						x		7	1	8	12.5	12.5	1.6
53	ZTF4P14						x		7	1	8	12.5	12.5	1.6
54	ZTF5P1						x		7	0	7	0.0	12.5	0.0
55	ZTF5P2						x		7	1	8	12.5	12.5	1.6
56	ZTF5P3		x						6	2	8	25.0	12.5	3.1

57	ZTF5P4		x					6	0	6	0.0	12.5	0.0
58	ZTF5P5		x					6	1	7	14.3	12.5	1.8
59	ZTF5P6	Planta Sana						7	0	7	0.0	0	0.0
60	ZTF5P7				x			6	1	7	14.3	12.5	1.8
61	ZTF5P8				x			6	2	8	25.0	12.5	3.1
62	ZTF5P9		x					6	2	8	25.0	12.5	3.1
63	ZTF5P10		x					5	4	9	44.4	12.5	5.6
64	ZTF5P11		x					6	2	8	25.0	12.5	3.1
65	ZTF5P12				x			5	2	7	28.6	12.5	3.6
66	ZTF5P13		x		x			5	3	8	37.5	25	9.4
67	ZTF5P14						$\bar{x}$	6.7	1.1	7.8	13.8	11.0	1.8
							% de hojas sanas	85.63					

**Tabla 4.** Formato para evaluar incidencia y severidad de la enfermedad, aplicado por cada zona, durante las 6 semanas de análisis. Elaborado por autores de monografía



**Imagen 19.** Aplicación de bioconsorcios in situ.



**Imagen 20.** Bioconsorcios provistos por Biotechnica S.A



**Imagen 21.** Hoja con síntomas de Sigatoka Negra.





**Imagen 22.** Toma de muestra de tejido foliar sintomatológico

## Anexo 4 Análisis complementarios

Informe de resultados



Página 1 de 3

Laboratorio de biotecnología  
[biotechnicalaboratorios@gmail.com](mailto:biotechnicalaboratorios@gmail.com)

### Resumen de análisis microbiológico

#### Datos de muestra

Cliente: **6R frituras**  
Tipo de muestra: **SUELO**  
Finca: **varios**  
Lote: **Varios**  
Fecha toma muestra: 24 Mayo 2021  
Responsable toma: estudiante /pasante

#### Resumen.

Se recibieron 3 muestras de suelo provenientes de cultivos de platano de **6R Frituras**, a como parte de investigación y desarrollo de la organización se realizó el análisis de las muestras ( bacterias y mohos presentes ) las muestra se componían de 3 muestras de un estudio de aplicación de bioensayos y 2 muestras de cultivos de platano abajo detalle

TIPO DE MUESTRA	CÓDIGO	EMPRESA	LOTE
SUELO	21-S15		Repeticion 1
SUELO	21-S16		Lote vacio ( sin identificar) repeticion 2
SUELO	21-S17		Repeticion 3

Fuente: Registros de laboratorio, Biotechnica S.A  
Método de análisis: Dilución Seriado, Recuento en placa. Identificación microscópica por claves taxonómica.

Especialista

Autorizado

Recibido

-----  
Lic. Jorge Lacayo  
Analista Microbiólogo

-----  
Lic. Henriques Malespín  
Responsable Laboratorio

-----  
Cliente

**Imagen 23.** Estudio de rizosfera previo a aplicación de bioinsumos para corroborar la ausencia de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus sp.* Estudio proporcionado por Biotechnica S.A

**RESULTADOS****CODIGO: 21-S15**

Lote: Finca ---- / lote ----, Tratamiento 1 uniforme

Fecha de análisis:

Tipo de muestra: suelo

Recuento microorganismos benéficos	Valores recomendados
<i>No se observaron ufc/ g de suelo</i>	mayor a $1 \times 10^4$ ufc/ g.
<b>Micología ( hongos)</b>	
<b>Fitopatógenos</b>	
<i>Rhizopus sp</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g
<i>Aspergillus niger</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g
<i>Aspergillus flavus</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g
<i>Rhizoctonia sp</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g

**CODIGO: 21-S16**

Lote: Finca ---- / lote ----, Tratamiento 1 uniforme

Fecha de análisis:

Tipo de muestra: suelo

Recuento microorganismos benéficos	Valores recomendados
<i>Bacillus sp</i> $3 \times 10^3$ ufc/ g	mayor a $1 \times 10^4$ ufc/ g.
<b>Micología ( hongos)</b>	
<b>Fitopatógenos</b>	
<i>Rhizopus sp</i> $1 \times 10^4$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g
<i>Aspergillus flavus</i> $1 \times 10^4$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g
<i>Rhizoctonia sp</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g

**CODIGO: 21-S17**

Lote: Finca ---- / lote ----, Tratamiento 1 uniforme

Fecha de análisis:

Tipo de muestra: suelo

Recuento microorganismos benéficos	Valores recomendados
<i>Bacillus sp</i> $2 \times 10^3$ ufc/ g	mayor a $1 \times 10^4$ ufc/ g.
<b>Micología ( hongos)</b>	
<b>Fitopatógenos</b>	
<i>Rhizopus sp</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g
<i>Aspergillus niger</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g
<i>Pythium sp</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g
<i>Rhizoctonia sp</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g	<i>menor a</i> $1 \times 10^2$ ufc/ g

**Notas:**

Esclerocios: son formas de resistencia asociados a moho blanco (*Sclerotium rolfsii*) que se forman para resistir los cambios climáticos y se activan cuando se dan las condiciones favorables de reproducción del fitopatógeno.

*Trichoderma sp* y *Bacillus sp*. Son indicadores de presencia de microorganismos benéficos.

**Imagen 24.** Estudio de rizosfera previo a aplicación de bioinsumo para corroborar la ausencia de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus sp* proporcionado por Biotechnica S A

**NOTAS:****Observaciones generales:**

Se encontraron 3 posibles fitopatógenos. La flora microbiana indica que las muestras 21-S17 y 21-S15 han sido de menor presión de patógenos. Esto puede estar asociado a la rotación de cultivo o varios ciclos sin cultivo plántero.

**Recomendaciones:**

Realizar pruebas para determinar estado de salud del suelo ( SOL VITA SOIL TEST) y obtener un puntaje de las áreas analizadas.

Realizar un muestreo cuando el cultivo este establecido 6 meses después de siembra.

**ANEXOS**

Sin imágenes

FIN DE REPORTE

**Notas:**

Esclerocios: son formas de resistencia asociados a moho blanco ( *Sclerotium rolfsii* ) que se forman para resistir los cambios climáticos y se activan cuando se dan las condiciones favorables de reproducción del fitopatógeno.

*Trichoderma* sp y *Bacillus* sp. Son indicadores de presencia de microorganismos benéficos.

**Imagen 25.** Estudio de rizosfera previo a aplicación de bioinsumo para corroborar la ausencia de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus* sp proporcionado por Biotechnica S A