



**UTPL**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE  
LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y  
NATURALES**

**CARRERA DE AGROPECUARIA**

**Aislamiento e identificación molecular de  
bacterias de la rizósfera del banano como potenciales  
biocontroladores de Fusarium**

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

**INGENIERA AGROPECUARIA**

**Autor:** Tambo Diaz, Marcia Gabriela.

**Director:** Loján Armijos Paúl Diego

LOJA

2023



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2023

## **Aprobación del director del trabajo de titulación**

Loja, 10 de enero de 2023

Doctor

Edwin Daniel Capa Mora

**Director de la carrera de Agropecuaria**

Ciudad.-

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Aislamiento e Identificación de bacterias de la rizosfera del banano como potenciales biocontroladores de Fusarium, realizado por Marcia Gabriela Tambo Diaz ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: PhD. Paúl Diego Loján Armijos.

C.I.:1103885396

Correo electrónico: pdlojan@utpl.edu.ec

### **Declaración de autoría y cesión de derechos**

Yo, Marcia Gabriela Tambo Diaz, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Aislamiento e Identificación de bacterias de la rizosfera del banano usando como posibles biocontroladores de Fusarium, de la Titulación Agropecuaria, siendo Paúl Diego Loján Armijos director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad".

Expreso tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las IES, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor. Así mismo autorizo a la SENESCYT a tener una copia del referido trabajo de titulación, con el propósito de generar un repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

.....

Autora: Marcia Gabriela Tambo Diaz

C.I.: 1106076340

Correo electrónico: [mgtambo@utpl.edu.ec](mailto:mgtambo@utpl.edu.ec)

### **Dedicatoria**

Le dedico el resultado de este trabajo, a mis padres José Gabriel Tambo Aguinsaca y Marcia Esmeralda Días Aguinsaca quienes me apoyaron en todo momento siendo el pilar de mi vida y los principales promotores de mis sueños; gracias por confiar y creer en mí, por siempre estar para extenderme su mano y enseñarme a valorar los resultados de un gran esfuerzo y por ser mi ejemplo, me faltan las palabras para agradecerles todo lo que me han enseñado para poder afrontar las dificultades que la vida me ponga en el camino; por todas las facilidades que me dieron para que pueda cumplir mis metas, todo lo que soy se los debo a ustedes por todo el sacrificio que han hecho para poderme brindar una carrera universitaria. Se que no ha sido fácil económicamente para ustedes, sin embargo, me lo han dado todo sin pedirme nada a cambio. Los quiero con todo mi corazón y este trabajo que me ha llevado mucho sacrificio se lo dedico para ustedes que son mi motor para seguir, viviré agradecida por todo lo que me han dado, los quiero mucho.

Rommel, que te puedo decir a ti, muchas gracias por todos estos años de conocernos y en los cuales hemos compartido tantas cosas, hemos pasado, por tanto, gracias por todo tu apoyo que me has brindado a lo largo de este tiempo y de esa manera poder continuar, por toda la ayuda que me has prestado para realizar mis deberes o trabajos y toda la paciencia y cariño que me has brindado, convirtiéndote en una de las personas más importantes y especiales para mí.

Gracias a toda mi familia a mis tíos, padrinos, primos quienes siempre han estado a mi lado apoyándome como una familia unida, por todos sus consejos y su ayuda me faltaría hojas para expresar lo agradecida que me siento con cada uno de ustedes han hecho mucho por mí y siempre han estado a mi lado.

Este trabajo también se lo dedico a mis cinco ángeles que se encuentran en el cielo y siempre me inculcaron el valor del estudio, respeto, trabajo, y a siempre seguir preparándome, estoy segura de que de donde estén están felices de este logro gracias por no desampararme, siempre estarán en mi mente y corazón.

Gabriela Tambo.

## **Agradecimiento**

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición he logrado cumplir una meta más en mí. Mi profundo agradecimiento a todos los docentes que conforman la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por brindarme todos sus conocimientos. De igual manera mis agradecimientos a la Universidad Técnica Particular de Loja, a toda la Facultad de Ingeniería Agropecuaria y de manera especial al Dr. Paúl Loján mi director de tesis por brindarme su apoyo y compartirme sus conocimientos y respaldarme para realizar mi tesis, gracias por toda su paciencia por su carisma que ha hecho que mi investigación sea más llevadera y la Dr. Lucia Guzmán quien durante este tiempo con las enseñanzas y sus valiosos conocimientos me ayudaron a poder redactar esta investigación ,mil gracias por su apoyo incondicional y su amistad.

## Índice de Contenidos

<b>Carátula .....</b>	<b>I</b>
<b>Aprobación del director del trabajo de titulación .....</b>	<b>II</b>
<b>Declaración de autoría y cesión de derechos.....</b>	<b>III</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>IV</b>
<b>Agradecimiento.....</b>	<b>V</b>
<b>Índice de Contenidos.....</b>	<b>VI</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>Objetivos. ....</b>	<b>6</b>
<b>Capitulo uno.....</b>	<b>7</b>
<b>Marco Teórico .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Definición de rizobacteria .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Control biológico .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Principales características del Bacillus spp .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Principales características de las Pseudomonas spp.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Generalidades del cultivo de banano .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5.1 Origen y distribución del banano .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5.2 Cultivares .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.3 Prácticas Recomendadas para el Manejo de la Plantación .....</b>	<b>11</b>
<b>1.6 Origen y distribución del Fusarium Raza 4 en banano .....</b>	<b>13</b>
<b>1.7 Epidemiología .....</b>	<b>15</b>
<b>1.8 Desarrollo de la enfermedad.....</b>	<b>15</b>
<b>1.9 Síntomas .....</b>	<b>15</b>
<b>1.10 Requerimientos edafoclimáticos para la propagación de la enfermedad.....</b>	<b>16</b>
<b>1.11 Manejo de la enfermedad .....</b>	<b>17</b>
<b>1.12 Impacto económico .....</b>	<b>17</b>

1.13 Control biológico .....	18
1.14 Importancia de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp. para el control del <i>Fusarium oxysporum</i> .....	18
Capítulo dos.....	20
Metodología .....	20
2.1 Área de estudio.....	20
2.2 Toma de muestras .....	20
2.3 Aislamiento de cepas de rizobacterias.....	21
2.4 Purificación de colonias de rizobacterias .....	21
2.5 Caracterización morfológica de las rizobacterias .....	21
2.6 Caracterización molecular .....	22
2.7 Criopreservación de bacterias.....	23
Capítulo tres.....	24
Resultados y discusión.....	24
3.1 Caracterización morfológica de las cepas aisladas. ....	24
3.2 Aislamiento rizobacterias.....	25
3.3 Caracterización Microscópica de las Cepas aisladas .....	25
3.4 Caracterización molecular .....	26
Discusión .....	29
Conclusiones .....	31
Recomendaciones .....	32
Referencias .....	33
Anexos.....	37

### Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica del Banano.....	10
Tabla 2 Clasificación taxonómica <i>Fusarium</i> .....	14
Tabla 3 Descripción de las características morfológicas macroscópicas.....	24

<b>Tabla 4 Características microscópica y tinción Gram las diferentes cepas de las rizobacterias .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 5 Análisis de homología en BLAST para los microorganismos aislados...</b>	<b>26</b>

#### **Índice de figuras**

<b>Figura 1 Período de la marchitez por Fusarium de las musáceas .....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 2 Área de Estudio.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3 Caracterización morfológica y aspecto de las bacterias .....</b>	<b>22</b>

## Resumen

Las rizobacterias, son un grupo amplio de bacterias que habitan la rizósfera de las plantas promoviendo su crecimiento mediante diferentes mecanismos, tales como: fijación de nitrógeno, absorción de minerales y biocontroladores de diferentes fitopatógenos como es el *Fusarium oxysporum f. sp.* Su estudio y utilización promueven una agricultura sostenible y un mayor rendimiento de los cultivos.

Las muestras de rizósfera utilizadas en el estudio provinieron de una plantación de banano a pequeña escala y sin aplicación de agroquímicos ubicada en el cantón Alamor, provincia de Loja. El aislamiento de rizobacterias en cultivos puros se lo realizó en medio Agar starch M-protein agar. Se lograron obtener un total de dieciséis cultivos puros. Posteriormente, se realizó la caracterización morfológica (macroscópica y microscópica) y molecular de las mismas. Los resultados indican la presencia de varios aislados principalmente dentro del género *Bacillus* y *Pseudomonas*. Aunque no se realizaron ensayos de antagonismo frente a *Fusarium oxysporum f. sp.* se conoce a través de la bibliografía consultada que muchos de ellos podrían tener un efecto para controlar el crecimiento de este patógeno, por lo que se podrían utilizar en ensayos futuros para disminuir la utilización de productos químicos, que provocan daño a la salud humana.

*Palabras clave:* *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium oxysporum f.*, rizósfera

### Abstract

Rhizobacteria are a large group of bacteria that inhabit the rhizosphere of plants, promoting their growth through different mechanisms, such as: nitrogen fixation, mineral absorption, and biocontrol of different phytopathogens such as *Fusarium oxysporum f. sp.*, its study and use promote sustainable agriculture and higher crop yields because these rhizobacteria are capable of producing endospores, that is, they have the primary function of ensuring their survival under environmental stresses.

The rhizosphere samples used came from a small-scale banana plantation and without the application of agrochemicals located in the Alamor canton, Loja province. The isolation of rhizobacteria in pure cultures was carried out in Agar starch M-protein agar medium, a total of sixteen pure cultures were obtained. Subsequently, the morphological (macroscopic and microscopic) and molecular characterization of them was carried out. The results indicate the presence of several isolates mainly within the genus *Bacillus* and *Pseudomonas*. Although antagonism tests against *Fusarium oxysporum f. sp.* It is known through the consulted bibliography that many of them could have an effect to control the growth of this pathogen, which makes this genus of bacteria very important since they would help us by maintaining a healthy ecosystem, reducing the use of chemical products. , which cause damage to human health and having a daily use of agrochemicals causes sterility in soils and resistance to various pathogens, so further studies are suggested to validate their antagonistic effect.

*Keywords:* *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium oxysporum f.*, rhizosphere

## Introducción

La agricultura moderna se debe dirigir hacia una agricultura sostenible con la finalidad de mantener un alto rendimiento de los cultivos, haciendo a la vez un eficiente aprovechamiento de los recursos y sobre todo preservando el agroecosistema. Una alternativa al uso excesivo de agroquímicos en la agricultura es el uso de microorganismos presentes en el suelo, como son las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) las mismas que colonizan de manera activa a la rizósfera de los cultivos y en algunos casos el sistema radicular de las plantas. Las PGPR a través de múltiples mecanismos directos (fijación de nitrógeno, la solubilidad de minerales) e indirectos (antagonismo de patógenos, activación de mecanismos de defensa de las plantas) promueven el desarrollo y producción de las plantas (Kloepper et al., 2015). El desarrollo de resistencias a pesticidas convencionales observada en los microorganismos patógenos en los últimos años hace necesario el desarrollo y aplicación de alternativas eficientes como el uso biocontroladores bacterianos para un apropiado control biológico de fitopatógenos (León et al., 2007). Además de agentes biocontroladores, algunas rizobacterias pueden ser promotores de la descontaminación de suelos, recuperación de ecosistemas y reforestación (Posada et al., 2021).

Los biocontroladores bacterianos pueden posteriormente ser formulados de tal forma que se pueda asegurar su sobrevivencia en campo y mantener su efecto, constituyendo así una alternativa ecológica para el control de ciertas enfermedades de importancia económica en los cultivos como es el caso del banano. Los biofertilizantes a base de las rizobacterias juegan un papel sumamente importante en mantener el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Posada et al., 2021).

El cultivo de banano es una de las actividades agrícolas más importantes para la economía del Ecuador, produciendo ingresos de aproximadamente US\$ 3 700 millones por año, las provincias de mayor producción son Guayas, El Oro y Los Ríos.

Para la producción bananera existen 3 niveles de acuerdo con el grado de tecnología usado en el mismo como son el tecnificado, semitecnificado y no tecnificado (CFN B.P., 2022).

La variedad que mayormente se produce es la Williams, el Gran enano como fruta fresca, el “Dominico”, el cual es el que se destinado para el consumo nacional mientras que el “Barraganete” se produce para la exportación. No obstante, a pesar de que es el cultivo de mayor importancia, no se encuentra libre de enfermedades y plagas que afectan de manera significativa a la producción.

En los últimos años se ha reportado que en algunas plantaciones de banano a nivel mundial han sido afectadas por fusariosis cuyo agente causal es el *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (FOC), conocida como el mal de Panamá denominada como una de las enfermedades fúngicas más graves entre en las productoras de banano y siendo uno de los causantes de diferentes enfermedades en distintas especies vegetales. El desarrollo de la enfermedad del *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* se da en los conductos de la xilema induciendo un taponamiento en los vasos y como efecto las hojas se tornan amarillentas causando el marchitamiento, hasta provocar la muerte de la planta (Acurio, 2010).

Entre los PGPR que más se han explotado para el biocontrol de microorganismos patógenos se puede mencionar a *Bacillus* spp, que tiene una amplia distribución, fácil aislamiento y se ha utilizado como fuente para la elaboración de una alta diversidad de antibióticos y enzimas con actividad antimicrobiana de amplio espectro. Sin embargo, para una mayor efectividad de las PGPR en campo, la aplicación de una correcta formulación, aplicación y en algunos casos adición de materia orgánica. Una estrategia interesante en este sentido es el desarrollo de fertilizantes bioorgánicos mediante la fermentación de compostas maduras enriquecidas con PGPR para suprimir enfermedades patógenas (Yuan et al., 2013)

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar las rizobacterias cultivables encontradas en la rizósfera del banano con el propósito de sentar una colección de cepas que se puedan utilizar en estudios posteriores para evaluar su efecto como biocontroladores de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* una de las enfermedades más importante en la actualidad en las plantaciones de banano a nivel mundial.

**Objetivos.****Objetivo general.**

- ❖ Aislamiento e identificación de rizobacterias como posibles antagonistas de *Fusarium* en plantaciones de banano.

**Objetivo específico.**

- ❖ Describir morfológicamente los aislados obtenidos.
- ❖ Identificar molecularmente los aislados obtenidos.
- ❖ Crioconservar los aislados bacterianos.

## Capítulo uno

### Marco Teórico

#### 1.1 Definición de rizobacteria

Dentro del reino de las plantas se ha logrado conocer un sin número de microorganismos asociados tanto perjudiciales como benéficos que en su conjunto se denominan microbioma. Al grupo de bacterias que habitan en las inmediaciones de la rizosfera (zona del suelo próxima a las raíces de las plantas) se las conoce como rizobacterias, éstas cumplen múltiples funciones benéficas en el desarrollo de las plantas, otras presentan efectos neutros en el desarrollo de la planta y algunas pueden ser patógenas. Aquellas bacterias en las que se ha comprobado su habilidad de promover el crecimiento de las plantas se denominan PGPR por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

#### 1.2 Control biológico

Consiste en utilizar organismos vivos para reducir el impacto de un organismo plaga haciéndolo menos dañino para el cultivo. A pesar de que el biocontrol es una técnica muy antigua se ha dejado de practicar por la propagación de insumos químicos que nos ayudan a controlar las plagas, enfermedades y malezas. Sin embargo, su uso indiscriminado ha generado una serie de problemas al medio ambiente a la salud humana y del suelo, por lo que es necesario buscar nuevamente alternativas de control biológico que amigables con el medio donde se va a aplicar (Jacas et al., 2005).

El uso de microorganismos para el control biológico de fitopatógenos constituye una alternativa eficaz y ecológica contribuyendo a una agricultura sostenible, ya que se disminuye de manera considerable el uso de productos químicos. Uno de los agentes de control biológico más estudiados son las bacterias pertenecientes a los géneros: *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y *Bacillus* (Whipps, 2001a).

Las especies del género *Bacillus* poseen características interesantes para el control de enfermedades de las plantas, debido a la capacidad para producir endosporas

resistentes a factores ambientales, pero también varias especies de este género produce una gran variedad de antibacterianos y antifúngicos. Entre las especies más utilizadas con este propósito se encuentran *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus* y *B. polymyxa*, son considerados como potenciales agentes de control biológico que nos permitan combatir enfermedades de importancia agrícola (Reinoso-Pozo et al., 2006).

### 1.3 Principales características del *Bacillus spp*

- ❖ Producen lipopéptidos, a los cuales se los ha estudiado por su actividad antibacteriana y fúngica. Esta acción se produce debido a la interacción de la membrana citoplasmática de bacterias u hongos, formando un desbalance osmótico y de esta manera provocando la muerte de la célula.
- ❖ Capacidad de producir antibióticos de una gran diversidad de especies para, que les otorga la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos.
  - ❖ Producción de enzimas líticas como quitinasas, proteasas y  $\beta$ -glucanasas las mismas que están involucradas en la degradación de la pared de agentes fitopatógenos como hongos.
  - ❖ Producción de sideróforos, que son estructuras proteicas de bajo peso molecular y con alta afinidad por el hierro.
  - ❖ Producción de  $\delta$ -endotoxinas producidas por *Bacillus thuringiensis* (Bt) formados por unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, pueden ser utilizados de manera eficaz para el control biológico de insectos (Villarreal-Delgado et al., 2018).

### 1.4 Principales características de las *Pseudomonas spp*

- ❖ Son excelentes colonizadoras de raíz y como agentes de control biológico.
- ❖ Poseen algunos mecanismos de promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal.
- ❖ Son una de las bacterias más adecuadas para su aplicación como inoculantes, se las puede utilizar en una extensa variedad de fuentes de carbono.

- ❖ son fáciles de manipular genéticamente.
- ❖ Se encuentran de manera abundante en suelos y raíces debido ya que son muy buenas al momento de colonizar.
- ❖ Tienen una alta tasa de crecimiento, y se las logra introducir en la rizosfera por medio de bacterización de semillas.
- ❖ Varias investigaciones han logrado aplicar de manera exitosa para el control de patógenos vegetales (Whipps, 2001)

## **1.5 Generalidades del cultivo de banano**

### **1.5.1 Origen y distribución del banano**

El banano pertenece a la familia de las musáceas, procedente de África fue una de las primeras frutas que cultivaron los agricultores primitivos (Escalante, 2011). Los bananos se originaron en las regiones del sureste asiático y el Pacífico occidental. El banano es uno de los frutos frescos más consumidos en el mundo, siendo comercialmente muy importante, constituye además el producto clasificado como el más importante (junto con el café) dentro del grupo de frutas y hortalizas por las naciones de América Central (ZIPMEC, 2013).

En el Ecuador, el cultivo del banano (*Musa paradisiaca*) es una de las actividades más importantes. El área destinada para este cultivo a nivel nacional es de 320.000 has, cuyos porcentajes de distribución son los siguientes: El Oro 25%, Guayas 26%, Los Ríos 41% y el 8% para otras provincias como Esmeraldas, Manabí y Azuay, lo que produce ingresos aproximadamente US\$. 3.700 millones por año (MAGAP, 2020).

Nuestro país se identifica por ser uno de los países de mayor producción de banano en el mundo en las áreas cultivadas que se encuentran ubicadas principalmente en el litoral ecuatoriano, obteniendo un alto porcentaje en exportaciones a mercados internacionales como Estados Unidos y la Comunidad Europea (MAGAP, 2020).

**Tabla 1***Clasificación taxonómica del Banano*

<i>Taxonómica del banano</i>	
Orden	Zingiberales
Familia	Musaceae
Género	Musa
Especie	Paradisiaca L

*Nota.* Fuente (Gómez, 2017)

### 1.5.2 Cultivares

Los productores tienen una serie de variedades que se adaptan a las condiciones edáficas, climáticas y de relieve de cada zona productiva. A continuación, los principales cultivares utilizados en el país (Escobedo, 2013).

- **Cavendish:** pertenece al grupo de musaceas denominadas AAA, considera una de las variedades, se la identifica por ser una planta con pseudotallo alto, hojas anchas, frutos medianos de excelente calidad, es resistente a la raza 1 de *Fusarium oxisporum*, tolera bastante bien al viento y a la sequía (Robinson & Galán Saúco, 2012).
- **Gross Michel:** también conocido como banano criollo, al igual que cavendish pertenece al grupo AAA, es susceptible al *Fusarium oxisporum*, se caracteriza por ser alto, las hojas miden alrededor de un metro de ancho por cuatro metros de largo y el racimo es de forma cilíndrica (Robinson & Galán Saúco, 2012).
- **Dátil:** pertenece al grupo AA, se caracteriza por una variedad de porte bajo, el pseudotallo es de coloración rojiza, hojas lanceoladas en posición electrófilo y los frutos son pequeños (Pérez, 2012).

### 1.5.3 *Prácticas recomendadas para el manejo de la plantación*

- **Preparación de suelo:** para preparar el suelo utilizamos dos métodos el tradicional y la mecanizada. El primer método nos da la ventaja que no deforma y aumenta la cantidad de materia orgánica debido a la descomposición de restos de cosecha, sin embargo la mano de obra resulta más elevada, mientras que el sistema mecanizado se realiza con maquinaria agrícola, antes de realizar cualquier siembra se realiza la nivelación del terreno, se ejecutan varias pasadas con el tractor arando el suelo para reducir la compactación y optimizar la infiltración. Posteriormente se procede a la construcción de domos, preparando los canales terciarios emparejando el suelo para eliminar encharcamientos y mantener el nivel freático a una profundidad mayor a 120 cm (Bolaños et al., 2002).
- **Material de propagación:** El cormo es uno de los materiales utilizados para la siembra de banano, los rebrotes son llevados primero al vivero y por medio de cultivo de tejidos; siendo uno de los métodos más utilizados ya que se garantiza plantas libres de enfermedades, presentando mayor vigor y uniformidad. Para seleccionar las semillas de banano debemos tener en cuenta que no tengan presencia de nematodos, que no contengan nematodos y procedan de terrenos libres de patógenos (Rodas & Godoy, 2003).
- **Apuntalamiento:** se utiliza para evitar que las plantas de banano se caigan durante el desarrollo tomando en cuenta el llenado del racimo que comprende desde la aparición hasta la cosecha.

Existen tres tipos de apuntalamiento:

- ❖ **Apuntalamiento rígido:** se utiliza materiales como bambú, caña brava o madera para resistir el peso de la planta; se ubican al sentido contrario de la caída de la planta.
- ❖ **Apuntalamiento con cuerda:** es catalogado como uno de los sistemas más utilizados, consiste en amarrar un extremo de la planta sosteniendo la tercera y cuarta hoja y el otro extremo es amarrado al sentido contrario de la caída. Para amarara utilizamos piola o cuerdas de polipropileno.

❖ **Apuntalamiento aéreo:** amarramos con una cuerda de polipropileno la tercera y cuarta hoja contrario a la caída; mientras que el otro extremo es amarrado a un cable aéreo utilizando un plomo. Una de las desventajas de este sistema es el alto costo en la implementación y mantenimiento de este.

- **Deshije:** consiste en la selección de hijo lateral prominente de donde se generará una contigua generación, eliminando los hijos agua (plantas improductivas); de este modo otro se conserva la secuencia de madre, hijo y nieto; manteniendo un ordenamiento lineal de las plantas (Saritama & Padilla, 2009).
- **Deshoja:** se limpia y elimina las hojas secas, con presencia de enfermedades que sirvan como puntos de inoculación de patógenos. Para realizar el corte de la hoja debemos realizarlo lo más cercano a la base si es necesario eliminar totalmente la hoja afectada y si observamos que las lesiones son mínimas se realiza una poda únicamente en la zona afectada. Si la planta ya se halla con el racimo eliminamos las hojas que estorben con el desarrollo del racimo permitiendo un mejor ingreso de la luz, calor y paso del aire (Rivera, 2012).
- **Fertilización:** morfológicamente tiene un sistema radical de rápido crecimiento vegetativo; lo que incita a que tenga una mayor capacidad de extracción de nutrientes del suelo, la fertilización se la puede efectuar de forma granular, orgánica y foliar dependiendo la necesidad que tenga el cultivo, para realizar una fertilización exitosa debemos realizar un análisis foliar y del suelo de esta manera garantizaremos la aportación de la cantidad necesaria de nutrientes a nuestro cultivo.
- **Manejo de malezas:** es de suma importancia ya que algunas de estas malezas compiten con el cultivo por la absorción de nutrientes, agua y algunas son hospedadas de una diversidad de enfermedades entre la más común encontramos la sigatoka negra. En la primera fase es donde más debemos controlar las malezas

ya que pueden provocar el atraso en el desarrollo de la planta (Rodas & Godoy, 2003).

- **Control de plagas:** Las plagas ocasionan varios daños en el cultivo de banano logrando ocasionar altas pérdidas, entre las principales plagas tenemos: Picudo negro. (*Cosmopolites sordidus*), Cochinilla, (*Pseudococcus elisae*), y Nematodos (*Radophulus similis*).

### 1.6 Origen y distribución del Fusarium Raza 4 en banano

La Fusariosis es una enfermedad con una alta mortalidad siendo la primera enfermedad del banano que se irradió globalmente en el siglo XIX. Su inicio tuvo lugar en Centroamérica ya que se cultivaba el banano Gros Michel el cual es susceptible a la enfermedad, en aquella época era el que dominaba el comercio de exportación mundial. En 1950s, Gros Michel fue sustituido por Cavendish. En el año 1980s, la cepa del Fusarium raza tropical 4, fue aislada de muestras en Taiwán teniendo en cuenta que Cavendish es susceptible a esta nueva cepa. A partir de allí se ha extendido a través de Asia, llegando a África en 2013 y en el 2019 ha alcanzado a llegar al continente americano (Ploetz, 2015). Dicha enfermedad probablemente se originó en el sureste asiático, pero el primer registro se efectuó en Australia en 1874 y en 1890 se reportó en Panamá. El RT4 fue reportada por primera vez en Taiwán en 1967 en cultivares Cavendish y a comienzos de los 1990s se estableció visiblemente la vulnerabilidad en Cavendish a la RT4, ya que el Fusarium terminó con plantíos enteros en Indonesia y Malasia (Maryani et al., 2019).

En el año 2000s, la RT4 ya se encontraba en Taiwán, Malasia, Indonesia, China, Filipinas y Australia. En el 2015 estaba presente en Australia, Líbano y Pakistán. En 2018 se confirmó su aparición en Myanmar, India y en Israel [3]. A mediados de 2019, se reportó en una plantación en la península de La Guajira, en Colombia, como primer caso de RT4 en el continente americano (Ploetz, 2006).

La propagación del *Fusarium R4T* más conocido como la enfermedad de Panamá es un riesgo inminente para la industria bananera de América Latina que sustenta la producción de consumo local y la de exportación, afectando también a los pequeños productores de plátano y banano (García-Velasco et al., 2020).

Los Países Miembros de la Comunidad Andina (Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú), el R4T tiene la categoría de Plaga Cuarentenaria, lo que resulta una mayor preocupación ya que en la región se producen cerca de 10.6 millones de toneladas de banano y 6.9 millones de toneladas de plátano (FAOSTAT, 2019).

Al no tener ningún tipo de opción para el control, la Enfermedad de Panamá se considera la más importante en el medio productivo del banano, con atención prioritaria en regiones de Latinoamérica y el Caribe (Ploetz, 2000).

Al presente, *Fusarium R4T* es la principal amenaza para la producción de banano, debido a su rápida extensión a otras regiones fuera del sudeste asiático, incluso a países en el medio este, el subcontinente de la India, África en donde el banano es considerado como uno de los alimentos principales de la dieta básica (Ordoñez et al., 2015).

Las plantas infectadas mueren incluso antes de producir racimos, por ende, la enfermedad reduce de forma importante los rendimientos en los campos afectados.

**Tabla 2**

*Clasificación taxonómica Fusarium*

<b>Clasificación taxonómica</b>	
Reino	Fungí
División	Deuteromycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Tuberculariaceae
Género	<i>Fusarium</i>

*Nota.*Fuente (EPPO, 2020)

## 1.7 Epidemiología

El *Fusarium sp* es un hongo Deuteromycete que genera esporas asexuales llamadas microconidias. Cuando se produce la germinación de las clamidosporas, éstas entran por las raíces, debido que son las más propensas a tener alguna herida y a contraer infecciones. El fusarium produce toxinas como licomarasmina, vasinfuscarina y ácido fusárico que provocan la quemadura del tejido vegetal y se da la coloración amarillenta (Sánchez, 2012).

## 1.8 Desarrollo de la enfermedad

Durante el desarrollo de la planta en un suelo que se encuentre con un alto grado de contaminación, el micelio y los tubos germinales se desarrollan en la parte final de la raíz. La propagación del micelio de modo intercelular comenzando de la raíz y continúa por los conductos de la xilema. Posteriormente, el crecimiento del micelio se da a través de la corteza de la raíz en el momento que alcanza los conductos de la xilema, llegando hasta la corola. Cuando el agua en la planta es limitada, se cierran las estomas, es cuando las hojas comienzan a presentar marchitez y perezcan generando que el hongo desarrolle tejidos parenquimáticos, para luego esporular (Agrios, 1995).

## 1.9 Síntomas

Una de las principales sintomatologías de *Fusarium sp* es el color amarillento en hojas basales las cuales se irán marchitando con el pasar de los días hasta secarse mientras se encuentran adheridas al tallo de la planta hasta que llegan a la parte apical de la planta. Algunas plantas desde el inicio de la infección presentan una severa marchitez en las horas donde hay más calor, algunas veces se logra observar que en las tardes de verano la planta quiere recuperarse, pero fortuitamente no lo logra marchitándose por completo y posteriormente la planta muere (González, 2006).

Las raíces laterales más pequeñas se pudren con mayor facilidad, mientras que las raíces principales y la base del tallo comienza a presentar necrosis vascular. Se realiza cortes de manera transversal en el tallo para observar un anillo de color café

justo en los haces vasculares lo que provoca la obstrucción impidiendo que la planta absorba agua y nutrientes del suelo. Cuando la planta es joven y es infectada por el hongo se marchita y muere en poco tiempo (Lara, 2010).

**Figura 1**

*Período de la marchitez por Fusarium de las musáceas*



*Nota.* El hongo se encuentra en el suelo y en planta infectadas en malezas hospedantes ya sean asintomáticas o que demuestren síntomas. La Propagación de la enfermedad se puede dar por: a) esquejes contaminados; b) sistemas de riego; c) tierra arrastrada por el viento o adheridas en zapatos, herramientas, equipos que tengan algún tipo de contacto con el hongo, Pérez 2015.

### 1.10 Requerimientos edafoclimáticos para la propagación de la enfermedad

El *Fusarium spp.* tiene una alta proliferación en zonas húmedas, el patógeno irrumpe la base de los tallos, casi siempre se da porque están cerca al área del suelo, y algunas veces logra entrar por la raíz de la planta raíces (Cook & Meyers, 2003).

Después de infectar la zona las esporas del hongo germinan provocando una herida, lo cual resulta favorecida por la alta humedad y temperatura entre 25 y 30°C se podría mantener a temperatura ambiental con una mínima de 5°C y una máxima de 37°C. La enfermedad avanza cuando existe un desbalance de nitrógeno en relación con el potasio, cuando se tiene una baja del abastecimiento de nitrógeno en épocas avanzadas del ciclo y cuando existe un desbalance del nitrógeno con relación al potasio en las primeras etapas (Pinto, 2012).

### **1.11 Manejo de la enfermedad**

Hasta el momento se sigue utilizando controladores químicos (fungicidas) los mismo que no logran combatir de manera efectiva la enfermedad mal de Panamá, pero hay un sin número de opciones para combatir al hongo, uno de ellos es la utilización de controladores biológicos en el cual utilizan microorganismos como las rizobacterias, la creación de plantas resistentes genéticamente a la enfermedad( pero se ha logrado observar un problema en el fruto ya que no presenta buenas características organolépticas), y otra alternativa es practicar buenas prácticas agrícolas y de esta manera prevenir la enfermedad en el cultivo del banano, si se observa la presencia del *Fusarium spp.* se debe poner de manera inmediata en cuarentena y eliminar los cultivos infectados por el agente patógeno. Por último, tenemos las prácticas culturales, las cuales se basan en poner en cuarentena a cultivos de banano y la eliminación de cultivos infectados por el patógeno, y tener siempre en cuenta lo importante que es la rotación de cultivos (Fiallos, 2009).

### **1.12 Impacto económico**

Alrededor de 150 países se dedican a la producción de banano, llegando a producir 78 millones de toneladas anuales aproximadamente (ZIPMEC, 2013). La exportación anual del banano en América Latina y el Caribe es alrededor de 13 millones de toneladas hasta el 2012. En el cual el Ecuador es uno de los pioneros en la producción y exportación del banano a nivel mundial todo esto debido a su calidad y sabor de la fruta, el ingreso del hongo fitopatógeno FOC RT4, sería catastrófico para todas producciones bananeras del país ya que contamina a la musáceas en general. Lo cual acarrearía a pérdidas económicas muy serias, afectando la seguridad alimentaria, y provocaría un gran impacto social ya que esta industria brinda trabajo a gran cantidad de personas que se dedican al sistema de producción y comercialización del banano. (Dita et al., 2013; FAOSTAT, 2019).

### 1.13 Control biológico

La Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) define al control biológico como el uso de organismos vivos, que sirven para evitar o reducir de alguna manera las pérdidas o daños provocados por agentes patógenos (Guédez et al., 2009), y de esta manera lograr un equilibrio poblacional. Los microorganismos biocontroladores deben tener ciertas peculiaridades como es una alta capacidad de colonizar la superficie donde será aplicado, tener una mayor rapidez que el patógeno para obtener nutrientes y sobrevivir a situaciones ambientales extremas. Los microorganismos biocontroladores deben mantener una estabilidad genética, para resistir a bajas concentraciones y bajos requerimientos nutricionales (Hernández et al., 2007). Los biocontroladores tiene un efecto más tardío en cotejo con los agroquímicos, pero una los microorganismos antagonistas suelen ser más estables y su duración es más larga que los agroquímicos.

Ventajas de un controlador biológico (Guédez et al., 2009):

- No tiene efectos nocivos con el ecosistema.
- La correlación costo-beneficio es rentable.
- Es imposible provocar una resistencia en el patógeno debido a que tiene varios mecanismos de acción.

### 1.14 Importancia de *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp.* para el control del *Fusarium oxysporum*

Durante años se ha realizado el manejo convencional de las enfermedades fitosanitarias utilizando agroquímicos, los mismo que han afectado de manera significativa al medio ambiente, a la salud de los seres vivos y provocando una disminución en la calidad de los productos de los cultivos. En la actualidad varios investigadores se están dedicando al estudio principalmente del *Bacillus* y *Pseudomonas* como posibles biocontroladores convirtiéndose en una alternativa ecológica para combatir enfermedades producidas por agentes patógenos (Corrales et al., 2011).

El *Bacillus* se caracteriza por ser una bacteria *productora* de antibióticos generando una serie de efectos antagónicos frente a los patógenos todo esto lo realiza sin producir efectos negativos a los seres vivos ni al medio ambiente preservando la calidad del cultivo. Se ha reportado que *Bacillus* consigue inhibir el crecimiento de 17 géneros de hongos fitopatógenos que provocan diversas enfermedades en cultivos de interés comercial como es el banano (Castellanos et al., 2008).

*Bacillus* logra estimular el sistema inmune de la planta, previniendo de futuras enfermedades de microorganismos patógenos. También se ha logrado demostrar que algunos *Bacillus* al tener contacto con la planta produce fitohormonas y fija nitrógeno (Tejera et al., 2011).

Las *Pseudomonas* son un género de bacterias que pueden producir compuestos antagónicos, como antibióticos, cianuro de hidrógeno, pioluteorina, enzimas hidrolíticas, etc (Weller, 2007).

Se ha logrado identificar que posee actividades antifúngicas hacia el *Fusarium* restringiendo la proliferación y la colonización de *Fusarium oxysporum* (Bradley & Punja, 2010).

Varias investigaciones han logrado demostrar que las *Pseudomonas* promueven el desarrollo de las plantas debido a que reducen el crecimiento de bacterias y hongos que son fitopatógenos a las plantas, debido a que secretan sustancias antibióticas en la rizosfera (Esquivel, 2009).

## Capítulo dos

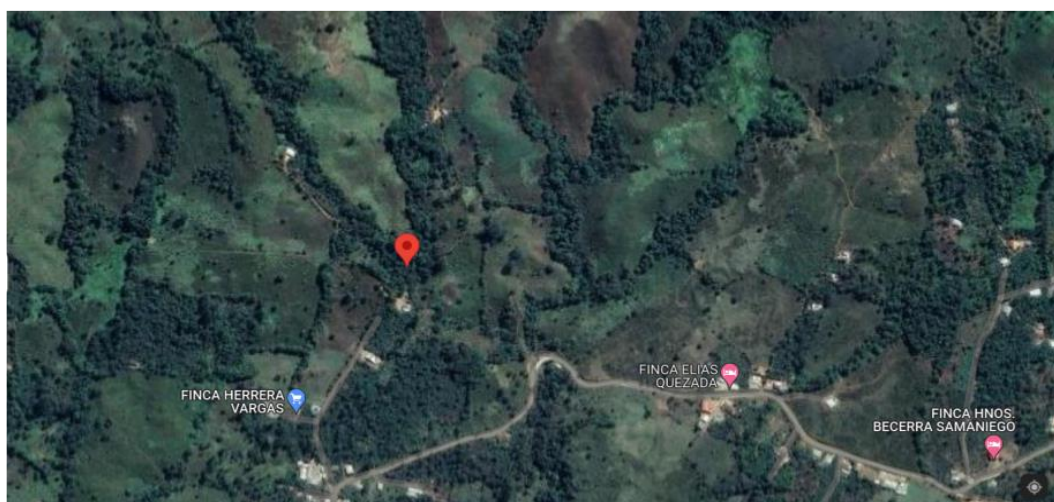
### Metodología

#### 2.1 Área de estudio

Para la colecta de suelo de rizósfera se seleccionó el cantón Puyango de la provincia de Loja en donde existen pequeñas plantaciones de banano que se manejan bajo un sistema de producción orgánica. Específicamente, se seleccionó una propiedad en la cabecera cantonal Alamor del cantón previamente mencionado. El cantón Alamor cuenta con un clima cálido subtropical, el sitio de colección se encuentra a una altura de 1.300 msnm, con una temperatura de 22°C, que fluctúa entre 15°C y 29°C. Con una latitud -4.012559 y longitud: - 79.961098.

#### Figura 2

*Área de Estudio*



*Nota.* Mapa satelital de la zona en la cual se tomaron las muestras

#### 2.2 Toma de muestras

El muestreo se realizó en el mes de mayo del 2022. Se colectaron muestras de suelo de rizosfera de 5 plantas de banano que no presentaran el ataque de fitopatógenos. Se recolectaron aprox. 500g de suelo de rizosfera por planta a una profundidad de 5 a 20 cm. Las muestras tomadas se transportaron al laboratorio de cultivo y conservación de microorganismos de la UTPL en donde se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento 7 días después.

### **2.3 Aislamiento de cepas de rizobacterias**

El suelo colectado se homogenizó y se dejó secar a la sombra por un periodo de 72h. Se tomó una muestra de 1g del suelo seco y se realizaron diluciones seriadas (Madigan et al., 2015). Para ello, se prepararon 6 tubos de ensayo con 9ml de agua destilada estéril. En el primer tubo, etiquetado como  $10^{-1}$  se adicionó el 1g de suelo colectado y se procedió con la dilución de este en los tubos subsecuentes hasta obtener una dilución final  $1 \times 10^{-6}$ . De cada dilución se sembraron 100  $\mu$ l (por triplicado) en cajas de Petri con medio Agar starch M-protein agar (Zucchi et al., 2011) al que se adicionó nistatina (20 $\mu$ g/ml). Las cajas Petri se incubaron en posición invertida a 27°C durante 72h.

### **2.4 Purificación de colonias de rizobacterias**

A las 72h de incubación se constató el crecimiento de varias colonias de morfología variada (diferente color, borde, elevación, etc.). Se seleccionaron las réplicas de la dilución  $10^{-3}$  para la purificación de las colonias bacterianas ya que en esta dilución las colonias estaban lo suficientemente separadas. Se tomaron 3 colonias representativas para cada una de las morfologías encontradas y se purificaron siguiendo la técnica del estriado en cajas Petri con medio starch M-protein agar (Madigan et al., 2015).

### **2.5 Caracterización morfológica de las rizobacterias**

Una vez obtenidas colonias con características morfológicas homogéneas (color, tamaño, borde, textura, etc.) los aislamientos bacterianos se caracterizaron morfológicamente de acuerdo con sus características macroscópicas: color, forma, tipo de borde, textura, elevación. Posteriormente, se realizó la caracterización microscópica con aumentos ópticos de (40X y 100X) para evaluar morfología celular, organización y reacción a la tinción Gram. Toda la caracterización de cultivos se llevó a cabo después de **las 48** horas de crecimiento a 27°C (García et al., 2015). Posterior a la caracterización los aislamientos se multiplicaron en medio líquido TSB adicionado con glicerina al 20% para su crioconservación a -20°C.

**Figura 3**

Caracterización morfológica y aspecto de las bacterias



Nota. Fuente: Velasco (2016)

## 2.6 Caracterización molecular

La extracción de ADN se realizó con el kit ChargeSwitch® gDNA Mini Bacteria de invitrogen. Posteriormente se llevó a cabo la amplificación del gen 16S rRNA utilizando primers generales para bacterias 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lillo et al., 2006) el cual amplifica un fragmento de aproximadamente 1400 pb. Para la PCR se utilizó la polimerasa Platinum PCR Super Mix de invitrogen. Las condiciones para la amplificación en el termociclador fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C x 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C x 30 s, alineamiento a 58°C x 30 s, extensión 72°C x 1.20 s y 1 ciclo de extensión final 72°C x 10 min. Para comprobar la amplificación del fragmento se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE. Una vez cargados los geles se examinaron en el trans-iluminador. Se calculó el número de pares de bases del fragmento de ADN amplificado por comparación con el marcador de 1 Kb plus de Invitrogen. Los productos de PCR fueron purificados con columnas de purificación Wizard PCR Clean Up System (Promega) y fueron secuenciados por el método de Sanger. El análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se realizó utilizando el programa Blast de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

## **2.7 Criopreservación de bacterias**

Se conservarán a -20 °C en crioviales de 2ml con Almidón, caseína-AC y Extracto de Levadura y se adiciona 15% de glicerol. (Jiménez, 2011).

## Capítulo tres

### Resultados y discusión

#### 3.1 Caracterización morfológica de las cepas aisladas.

**Tabla 3**

*Descripción de las características morfológicas macroscópicas para las diferentes cepas de bacterias el código de la cepa hace referencia al número de caja y a las iniciales de un nombre*

Cepa	Borde Colonia	Forma Colonia	Textura	Elevación	Color
C1RGTL	Filamentoso	Rizoide	Rugosa	Plana	Crema translúcida
C2RGTL	Lobulado	Irregular	Lisa	Plana	Blanca translúcida
C3RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Elevado	Crema translúcida
C4RGTL	Lobulado	Irregular	Lisa	Plana	Blanca translúcida
C5RGTL	Entero	Irregular	Mucoide	Elevado	Crema translúcida
C6RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Elevado	Crema translúcida
C7RGTL	Ondulado	Irregular	Lisa	Plana	Blanca translúcida
C8RGTL	Entero	Circular	Mucoide	Elevado	Blanca translúcida
C9RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Elevado	Crema translúcida
C10RGTL	Lobulado	Irregular	Mucoide	Elevado	Crema translúcida
C11RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Elevado	Crema translúcida
C12RGTL	Filamentosa	Rizoide	Mucoide	Elevado	Crema translúcida
C13RGT	Entero	Circular	Lisa	Plana	Crema translúcida
C14RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Convexa	Amarilla-Crema
C15RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Elevado	Crema translúcida
C16RGTL	Filamentosa	Rizoide	Lisa	Plana	Blanca translúcida
C17RGTL	Lobulado	Irregular	Rugoso	Elevado	Blanca translúcida
C18RGTL	Ondulado	Irregular	Lisa	Elevado	Crema translúcida
C19RGTL	Lobulado	Irregular	Lisa	Plana	Blanca translúcida
C20RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Convexa	Amarilla-Crema
C21RGTL	Lobulado	Irregular	Rugoso	Elevado	Blanca translúcida
C22RGTL	Filamentosa	Rizoide	Mucoide	Pulvida	Crema translúcida
C23RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Elevado	Crema translúcida
C24RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Elevado	Crema translúcida
C25RGTL	Filamentosa	Rizoide	Rugosa	Elevado	Crema translúcida

*Nota.* Observaciones microscópicas de las características morfológicas

### 3.2 Aislamiento rizobacterias

Al finalizar la fase de aislamiento se obtuvieron un total de 25 cepas bacterianas que fueron caracterizadas morfológicamente tanto a nivel macroscópico como microscópico. Las características macroscópicas de estas cepas se encuentran descritas en la tabla 1 y las microscópicas en la tabla 2.

### 3.3 Caracterización Microscópica de las Cepas aisladas

En la tabla 4. Se puede observar la caracterización microscópica de las rizobacterias demostrando que hay bacilos Gram negativos de color rojo y con bordes redondeados.

**Tabla 4**

*Características microscópica y tinción Gram las diferentes cepas de las rizobacterias*

CEPA	FORMA	TINCIÓN GRAM
C1RGTL	Bacilos	Gram negativa
C2RGTL	Bacilos	Gram negativa
C3RGTL	Bacilos	Gram negativa
C4RGTL	Bacilos	Gram negativa
C5RGTL	Bacilos	Gram negativa
C6RGTL	Bacilos	Gram negativa
C7RGTL	Bacilos	Gram negativa
C8RGTL	Bacilos	Gram negativa
C9RGTL	Cocos	Gram negativa
C10RGTL	Bacilos	Gram negativa
C11RGTL	Cocos	Gram negativa
C12RGTL	Bacilos	Gram negativa
C13RGT	Bacilos	Gram negativa
C14RGTL	Bacilos	Gram negativa
C15RGTL	Cocos	Gram negativa
C16RGTL	Bacilos	Gram negativa
C17RGTL	Cocos	Gram negativa
C18RGTL	Cocos	Gram negativa
C19RGTL	Cocos	Gram negativa
C20RGTL	Cocos	Gram negativa
C21RGTL	Cocos	Gram negativa

C22RGTL	Cocos	Gram negativa
C23RGTL	Bacilos	Gram negativa
C24RGTL	Cocos	Gram negativa
C25RGTL	Cocos	Gram negativa

*Nota:* Resultados de tinción gram y características microscópicas de las bacterias

### 3.4 Caracterización molecular

Se hizo la electroforesis en gel de agarosa al 1% y TBE, las muestras se examinaron en la foto documentador UV y el número de pares de bases de cada banda se determinó por comparación con el marcador de 1 Kb plus. De ocho de las 25 cepas analizadas (C18RGTL, C19RGTL, C20RGTL, C21RGTL, C22RGTL, C23RGTL, C24RGTL, C25RGTL) no se pudo obtener producto de amplificación por lo que fueron descartadas.

De los 17 aislamientos restantes se obtuvieron ampliaciones con una buena concentración (colocar el rango según el análisis en nanodrop) por lo que se realizó el envío de las muestras a la empresa Macrogen (Korea) para su respectivo análisis. Las secuencias fueron cargadas a la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para realizar la comparación con las secuencias depositadas en la base de datos pública de nucleótidos GenBank. Los resultados del análisis en BLAST mostraron que para varios de los aislamientos se encontró un alto porcentaje de similitud con secuencias de especies pertenecientes a los géneros Bacillus (11 cepas), Peribacillus (2), Pseudomonas (1), Enterobacter (1), una cepa bacteriana no cultivada (C16RGTL) y Bacterium strain ANA (1) ver tabla 3.

**Tabla 5**

*Análisis de homología en BLAST para los microorganismos aislados.*

<b>CÓDIGO CEPA</b>	<b>ESPECIE BLAST</b>	<b>% DE COBERTURA</b>	<b>E VALUE</b>	<b>% DE SIMILITUD</b>
C1RGTL	<i>Bacillus mycoides strain JAS823 chromosome, complete genome</i>	90%	0.0	97.10%

C2RGTL	<i>Bacillus cereus</i> strain WHS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	0.0	94.32%
C3RGTL	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain D59-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	93.74%
C4RGTL	<i>Enterobacter asburiae</i> strain SA66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	73%	0.0	88.93%
C5RGTL	<i>Bacillus</i> sp. (in: <i>Bacteria</i> ) strain P571 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0.0	87.60%
C6RGTL	<i>Bacillus</i> sp. (in: <i>Bacteria</i> ) strain 816OP10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	96.53%
C7RGTL	<i>Bacillus xiamenensis</i> strain GAU-39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	0.0	97.05%
C8RGTL	<i>Bacillus paramycooides</i> strain SQ21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	94.96%
C9RGTL	<i>Bacillus paramycooides</i> strain BY9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	0.0	95.86%
C10RGTL	<i>Pseudomonas</i> sp. Raj12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0.0	96.85%
C11RGTL	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain D59-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	96.06%
C12RGTL	<i>Peribacillus frigiditolerans</i> strain EH13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0.0	97.19%
C13RGT	<i>Bacillus paramycooides</i> strain SQ21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	94.98%

C14RGTL	<i>Peribacillus butanolivorans strain PHB-7a chromosome, complete genome</i>	94%	0.0	96.26%
C15RGTL	<i>Bacterium strain ANA_YJ_J18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	98%	0.0	95.96%
C16RGTL	<i>Uncultured bacterium clone nby549c05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	90%	0.0	89.82%
C17RGTL	<i>Bacillus cereus strain 1.4PT6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	97%	0.0	92.72%

---

*Nota:* Los resultados obtenidos con las bacterias con mayor porcentaje se encuentran la especie de *Bacillus*, que se conoce que tiene la capacidad de llevar a cabo el control biológico en enfermedades de las plantas por patógenos fúngicos como es el *Fusarium*, todo esto se da por su versatilidad metabólica que lo vuelve una bacteria capaz de producir endosporas.

## Discusión

Las rizobacterias cumplen diferentes procesos que involucran la salud de las plantas y la fertilidad del suelo mediante la producción de sustancias bioactiva. Entre los géneros de rizobacterias mayormente reportados como PGPR, *Bacillus* es uno de los géneros más relevantes para incitar el crecimiento vegetal y el control biológico, logrando suprimir agentes patógenos mediante la producción de antibióticos o la estimulación de las vías de defensa del huésped (Van Loon, 2007).

En nuestro estudio se lograron aislar un total de 25 aislamientos puros, pero solo se lograron identificar 17 de ellos debido a que los productos de PCR de los 8 aislamientos restantes fueron de baja calidad por lo que se necesita de ensayos posteriores para determinar las condiciones óptimas para la identificación de estas especies. Dentro de los aislamientos identificados los géneros más frecuentes fueron *Bacillus* y *Pseudomonas*, que según varios estudios presentan capacidad antifúngica debido a la producción de antibióticos polipeptídicos que actúan sobre la pared celular de los hongos por lo que son considerados como biocontroladores efectivos frente al *Fusarium sp.* En este sentido se ha reportado que el género *Bacillus* origina compuestos antifúngicos (Prapagdee et al., 2008) y enzimas quitinasas que logran degradar las paredes celulares de *Fusarium oxysporum*, lo que las convierte en unas bacterias con un alto potencial como agente de control en plantas tropicales como las musáceas (Pryor et al., 2006). El estudio realizado por Constanza et al., (2012) evaluó el efecto biocontrolador de *Bacillus spp.* frente a *Fusarium spp.* muestran un gran desempeño en las pruebas antagónicas de las cuales se ha podido producir una serie de antibióticos de amplio espectro, como fungicidas comerciales. Además, el género *Bacillus*, tiene la una ventaja adicional que es su habilidad de formar endosporas como un mecanismo de resistencia que ha sido utilizada para la creación de biofertilizantes y biocontrolares (Pérez-García et al., 2011).

*Pseudomonas* es un género que contiene especies Gram negativa que habita en varios ambientes, acuáticos y terrestres. Las temperaturas óptimas para su desarrollo se encuentran entre los 25-30°C, pero pueden resistir hasta 42°C y un pH neutro. No crecen en ambientes ácidos (Sivamani & Gnanamanickam, 1987). La especie logra producir varios beneficios los cuales son: síntesis de fitohormonas, fijación nitrógeno y estimula el desarrollo radicular mejorando el crecimiento de las plantas, por su alta capacidad de adaptación y colonización de suelos (Sumei et al., 2017).

Las bacterias *Pseudomonas*, son usadas para combatir enfermedades fúngicas ya que cuentan con un metabolismo adaptativo y la capacidad para producir compuestos antifúngicos (Santacruz et al., 2012). Por ende, las *Pseudomonas* son de alto interés en el campo del control biológico ya que también nos ayudan a promover el desarrollo vegetal y eliminar el crecimiento de patógenos de raíz (Pérez et al., 2015).

Particularmente, las *Pseudomonas* han despertado interés científico en los últimos años (Santacruz et al., 2012) ya que se ha podido observar que estas bacterias pueden atrapar el hierro del ambiente rizosférico, imposibilitando que esté disponible para los patógenos. Así, las *Pseudomonas* tienen ventaja para ir colonizando, desplazando al patógena del suelo (Santoyo et al., 2010).

La bacteria *Pseudomonas* logra inhibir el crecimiento del *Fusarium*, las plantas afectadas por la marchites se logra reducir de manera significativa ya que reduce la colonización del *Fusarium* a las raíces en un 72%, todo esto se puede lograr si se aplica la *Pseudomonas* 90 días antes de la inoculación del patógeno. Las plantas de banano que fueron tratadas con la *Pseudomonas* no fueron atacadas por el *Fusarium* (Esquivel, 2009).

A pesar de que en el presente estudio no se realizaron ensayos de antagonismo de las cepas de rizobacterias aisladas, este es un reporte preliminar de la diversidad de

bacterias presentes en la rizosfera del banano y el aislamiento de éstas constituye una línea base desde donde se pueden hacer ensayos de antagonismo futuro.

## Conclusiones

La caracterización morfológica de las cepas nos indica una gran diversidad de morfologías de las colonias y de morfología celular de las 25 cepas aisladas.

La caracterización molecular nos permitió conocer la presencia de una gran cantidad de cepas de *Bacillus*, que se conoce que a través de varios estudios que pueden ayudar a controlar el *Fusarium* en las *musáceas*.

Es necesario estudios adicionales para evaluar la efectividad de las cepas aisladas y caracterizadas para el control efectivo de *Fusarium oxysporium*.

### **Recomendaciones**

Se debe realizar ensayos que permitan evaluar la capacidad de las cepas para contrarrestar la enfermedad del *Fusarium*, y de esta manera poder observar que tan eficaz es para el control del patógeno.

Es necesario la realización una investigación más a fondo sobre los biocontroladores a base de los *Bacillus*, para de esta manera poder fomentar más su utilización en las producciones bananeras y de esta manera minimizar la utilización de agroquímicos.

## Referencias

- Acurio, R. (2010). *Técnicas de prevención y control de Fusarium oxysporum f.sp. Dianthi en clavel Dianthus caryophyllus y su incidencia en la productividad [Universidad Tecnica de Ambato]*.  
[https://handbook.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/AGRARIAS\\_7/Ingenieria%20Agronomica/40.pdf](https://handbook.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/AGRARIAS_7/Ingenieria%20Agronomica/40.pdf)
- Agrios, N. (1995). *Clasificación de hongos fitopatógenos. Fitopatología. 2a. Edición. México: Limusa SA de CV, 280-28*. <https://bibliotecaia.ism.edu.ec/Repository/FitopatologiaGeorgeN-Agrios.pdf>
- Bolaños, M. , Aranzazu, F. , Celis, L. , Morales, H. , & Zuluaga, L. ,. (2002). *Fertilización e incidencia de Sigatoka Negra (Mycosphaerella fijiensis morelet) en plátano dominico-hartón (MUSA AAB) en Armenia, Colombia*.
- Bradley, G. G., & Punja, Z. K. (2010). Composts containing fluorescent pseudomonads suppress fusarium root and stem rot development on greenhouse cucumber. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(11), 896–905. <https://doi.org/10.1139/W10-076>
- Castellanos, J. , Ortiz, L. , Oliva, P. , Fresneda, J. , Dueñas, M. , Fraga, S. , & Meléndez, O. (2008). *Estudios relacionados con el uso de Bacillus subtilis en el control de hongos fitopatógenos. Revista Agrotécnica de Cuba. Recuperado de la página*. [http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia\\_05\\_2008/agrot2005-1/EPRO65.pdf](http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/agrot2005-1/EPRO65.pdf)
- CFN B.P. (2022). *FICHA SECTORIAL BANANO Y PLÁTANO SUBGERENCIA DE ANÁLISIS DE PRODUCTOS Y SERVICIOS*.
- Constanza, L. , Sánchez, L. C., & Joya, J. A. (2012). Efecto biocontrolador de Bacillus spp., frente a Fusarium sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo

(*Thymus vulgaris* L.). 2012. Nova. *Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*  
*Issn 1794 - 2470 Vol., 10.*

Corrales, C. , Sánchez, L. , Cuervo, J. , Bautista, D. , González, L. , & Guevara, M.  
(2011). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium*  
spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *Revista NOVA.*  
<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/440/1113>

EPPO. (2020). *EPPO Datasheet: Fusarium oxysporum f. sp. albedinis.*

Escalante. (2011). *UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL FACULTAD DE CIENCIAS  
ECONÓMICAS TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE ECONOMISTA  
TEMA: Producción y Precio del Banano en.*

Escobedo, A. (2013). *Cadena Productiva de banano criollo.* [www.catie.ac.cr](http://www.catie.ac.cr)

Esquivel, Eduardo. R. (2009). *Observaciones sobre el control biológico del Mal de  
Panamá del banano, Fusarium oxysporum f.sp. cubense.* *Agrociencia  
Panamensis.* Consultado en línea. [http://agrociencia-  
panama.blogspot.com/2009/01/observaciones-sobre-el-control.html](http://agrociencia-panama.blogspot.com/2009/01/observaciones-sobre-el-control.html)

FAOSTAT. (2019). <http://faostat.org/>.

Fiallos, D. (2009). *Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de  
Panamá (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) en el cultivar Gros Michel (AAA)  
(Tesis de maestría).* Recuperado del Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñanza de la página: <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/4238>

García-Velasco, R., Portal-González, N., Santos-Bermúdez, R., Rodríguez-García, A.,  
& Companioni-González, B. (2020). Genetic improvement for resistance to  
*Fusarium* wilt in banana. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of  
Phytopathology*, 39(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2008-2>

Gómez, M. (2017). *Efectos de la suma térmica en el desarrollo de racimos de banano (Musa acuminata AAA) en dos zonas productoras distintas.*

González, P. (2006). *ENFERMEDADES DEL TOMATE Marchitamiento vascular del tomate Fusarium oxysporum f.sp lycopersici.*

[www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium\\_tom.html](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html)

Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., & Olivar, R. (2009). *Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Revista Academia, 13 (3), 50-74. Recuperado de (Issue 13).*

<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/29752/1/articulo5.pdf>

Hernández, A. , Bautista, S. , Velázquez, M. , & Hernández, A. (2007). *Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en Frutos. Revista Mexicana de Fitopatología, 25(1), 66–74.*

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225109>

Jacas, J., Caballero, P., & Avilla, J. (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades. Universidad Pública de Navarra. Editorial Universidad de Jaume I. Servicio de Comunicación y Publicaciones, Castellón de la Plana, España.*

Kloepper, J., Mejía, C., Moreno, C., & Izquierdo, L. (2015). *Combining biocontrol and physical strategy to manage Fusarium wilt based on the study of the growth response of the antagonist Bacillus amyloliquefaciens (Bs006) and pathogen to abiotic factors.*

[https://www.researchgate.net/publication/309312470\\_Combining\\_biocontrol\\_and\\_physical\\_strategy\\_to\\_manage\\_Fusarium\\_wilt\\_based\\_on\\_study\\_of\\_growth\\_response\\_of\\_the\\_antagonist\\_Bacillus\\_amyloliquefaciens\\_Bs006\\_and\\_pathogen\\_to\\_abiotic\\_factors](https://www.researchgate.net/publication/309312470_Combining_biocontrol_and_physical_strategy_to_manage_Fusarium_wilt_based_on_study_of_growth_response_of_the_antagonist_Bacillus_amyloliquefaciens_Bs006_and_pathogen_to_abiotic_factors)

Lara, L. (2010). *Estudio de la eficiencia de Trichoderma asperrellum cepa G-008 para el manejo del complejo de marchitez del melón. [Tesis de grado, . Universidad*

*Católica de Santiago de Guayaquil*].

<http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/995>

- León, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D., Patiño, L., & Zerpa, R. (2007). Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú Bioactives Actinomycetes of marine sediment from the central coast of Peru. In *Rev. peru. biol* (Vol. 14, Issue 2). Diciembre.  
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htmRev.peru.biol.14>
- MAGAP. (2020). *FICHA SECTORIAL BANANO Y PLÁTANO SUBGERENCIA DE ANÁLISIS DE PRODUCTOS Y SERVICIOS*.
- Maryani, N., Lombard, L., Poerba, Y. S., Subandiyah, S., Crous, P. W., & Kema, G. H. J. (2019). Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology*, 92, 155–194. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.003>
- Ordoñez, N., García-Bastidas, F., Laghari, H. B., Akkary, M. Y., Harfouche, E. N., al Awar, B. N., & Kema, G. H. J. (2015). First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 causing Panama disease in Cavendish bananas in Pakistan and Lebanon. *Plant Disease*, 100(1), 209. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-14-1356-PDN>
- Pérez. (2012). *Respuesta de nueve cultivares de musáceas en la etapa vegetativa a cuatro niveles de sombra agroforestal*.
- Pérez, Á. S., Coto, O., Echemendía, M., & Ávila, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Rev. Protección Veg*, 30(3), 225–234.
- Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in

- agriculture. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 187–193).  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Ploetz, R. C. (2000). *Plant Health Management Panama Disease: A Classic and Destructive Disease of Banana*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2000-1204>
- Ploetz, R. C. (2006). Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*, 96(6), 653–656.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0653>
- Ploetz, R. C. (2015). Fusarium wilt of banana. In *Phytopathology* (Vol. 105, Issue 12, pp. 1512–1521). American Phytopathological Society.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Posada, C. A. M., Mejía, D. D. P., Polanco, E. D., & Cardona, A. J. A. (2021). Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR): una revisión sistemática 1990-2019. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(2), 161–178. <https://doi.org/10.22490/21456453.4040>
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C., & Mongkolsuk, S. (2008). Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. *Int. J. Biol. Sci*, 4. [www.ncbi.nlm.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/)
- Pryor, S. W., Gibson, D. M., Krasnoff, S. B., & Walker, L. P. (2006). Identification of antifungal compounds in a biological control product using a microplate inhibition bioassay. *Am Soc Agric Biol Eng. Transactions of the ASABE*, 49(5), 1643–1649.
- Reinoso-Pozo, Y. , L., Casadesús-Romero, A., García-Suárez, J., Gutiérrez-Pérez, & v. Álvarez-Rivera. (2006). *Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género Bacillus antagonistas de Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*, 10(3): 187-191.

Rivera, M. D. (2012). *MANUAL PRÁCTICO PARA EL CULTIVO SUSTENTABLE DEL PLÁTANO*.

Robinson, J. C., & Galán Saúco, V. (2012). *Plátanos y bananas*. Mundi-Prensa.

Rodas, L., & Godoy, N. (2003). *EFFECTO DE LAS PRÁCTICAS CULTURALES SOSTENIBLES EN EL MANEJO DE MALEZAS DEL CULTIVO DE BANANO (MUSA AAA) DE LA UNIVERSIDAD EARTH*.

Sánchez, M. (2012). *Manejo de enfermedades del tomate. Curso Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Tomate, Chile y Papa (en línea). (Veracruz, México). Curso de Incapa. 18 p.*

Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). *Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis*.

Santoyo, G., Valencia, E., Orozco, Ma. del C., Peña, J. J., & Farías, R. (2010). *Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de Pseudomonas fluorescens ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. Terra Latinoamericana, 28(1)*.  
[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792010000100006](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792010000100006)

Sivamani, E., & Gnanamanickam, S. S. (1987). *Biological control of Fusarium oxysporum f.sp. cubense in banana by inoculation with Pseudomonas 107, 3-9. fluorescens*. <https://doi.org/10.1007/BF02371537>

Sumei, Y., Teng, C., Liang, J., Song, T., Dong, L., Bai, X., Jin, Y., & Qu, J. (2017). *Characterization of siderophore produced by Pseudomonas syringae BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of Fusarium oxysporum. Journal of Microbiology, 55(11), 877–884*.  
<https://doi.org/10.1007/s12275-017-7191-z>

- Tejera, B. , Rojas, M. , & Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista de Ciencias Biológicas*. (42) 3. , 131–138.  
<http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>
- van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. In *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 119, Issue 3, pp. 243–254).  
<https://doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1).  
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250–256.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0250>
- Whipps, J. M. (2001a). *Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
- Whipps, J. M. (2001b). *Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany*, 52(Spec Issue).
- Yuan, J., Ruan, Y., Wang, B., Zhang, J., Waseem, R., Huang, Q., & Shen, Q. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria strain *Bacillus amyloliquefaciens* njn-6-enriched bio-organic fertilizer suppressed fusarium wilt and promoted the growth of banana plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16), 3774–3780.  
<https://doi.org/10.1021/jf400038z>

ZIPMEC. (2013). *Banana - historia, producción, comercio*.

<http://www.edysma.com/dachi.php?mit=zipcom>

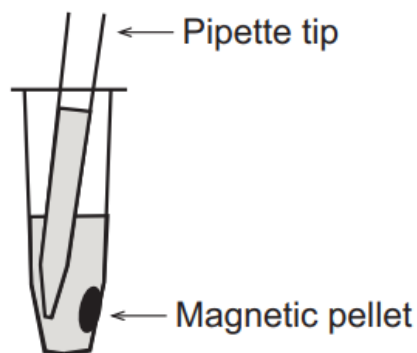
## Anexos

### Protocolo de aislamiento de ADN genómico utilizando el minikit de bacterias

Instrucciones para aislar ADN genómico de 0,5 mL cultivo bacteriano o una sola colonia como se describe en esta sección. El procedimiento está diseñado para aislar ADN genómico utilizando el procedimiento ChargeSwitch® Magnetic Beads en un tiempo total de 15 minutos después de la preparación de la muestra.

#### Procedimiento.

1. Vórtice el tubo que contiene el ChargeSwitch® Magnetic Perlas para resuspender completamente y distribuir uniformemente las perlas en el búfer de almacenamiento.
2. Agregue 40  $\mu$ L de perlas magnéticas ChargeSwitch® a la muestra del paso 7 del protocolo de lisis de células bacterianas y mezcle bien.
3. Pipetee hacia arriba y hacia abajo suavemente para mezclar sin formar burbujas.
4. Agregue 300  $\mu$ L de tampón de unión (B8) y mezcle usando 5–6 pulsos (1–2 segundos) en un mezclador de vórtice. Nota: El tampón de unión (B8) reduce el pH de la solución. Las cuentas magnéticas ChargeSwitch® ahora tienen una carga positiva y se unirá al ADN. Las cuentas pueden agrupar.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
6. Coloque la muestra en la gradilla magnética MagnaRack™ para 1 minuto o hasta que las perlas hayan formado una bolita apretada.
7. Sin retirar el tubo del MagnaRack™, retire con cuidado y deseche el sobrenadante sin perturbando el sedimento de perlas inclinando la pipeta de tal que la punta apunte lejos del perdigón.



### Lavado de ADN

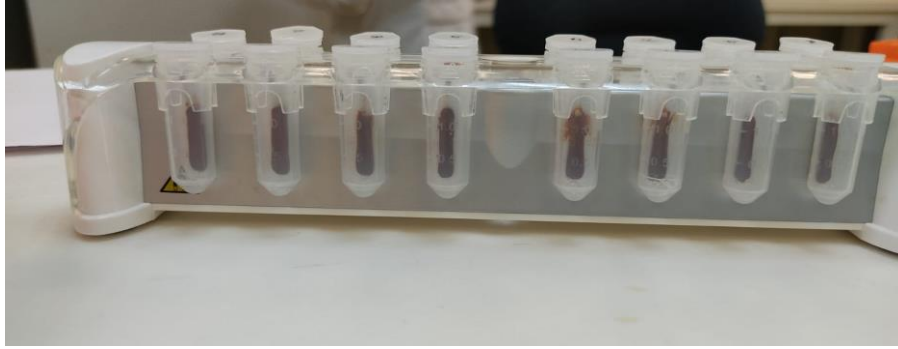
1. Retire el tubo que contiene las perlas magnéticas granuladas del MagnaRack™ (Paso 7, Unión de ADN).
2. Agregue 1 ml de tampón de lavado (W12) al tubo y pipetee y hacia abajo suavemente 3 veces usando una punta de pipeta de 1 ml para mezclar la muestra sin formar burbujas.
3. Coloque la muestra en la gradilla magnética MagnaRack™ un minuto o hasta que las perlas hayan formado una bolita apretada.
4. Sin quitar el tubo del MagnaRack™, retire con cuidado y deseche el sobrenadante sin perturbar el sedimento de perlas inclinando la pipeta de tal que la punta apunte lejos de la pastilla.
5. Retire el tubo que contiene las perlas magnéticas granuladas el MagnaRack™.
6. Agregue 1 ml de tampón de lavado (12) al tubo y mezcle pipeteando hacia arriba y hacia abajo suavemente 3 veces con una pipeta de 1 ml punta de pipeta
7. Coloque la muestra en la gradilla magnética MagnaRack™, 1 minuto o hasta que las perlas hayan formado una bolita apretada.
8. Sin retirar el tubo del MagnaRack™, retire con cuidado y deseche el sobrenadante sin perturbando el sedimento de perlas inclinando la pipeta de tal que la punta apunte lejos de la pastilla.

### Elución del ADN

1. Retire el tubo que contiene las perlas magnéticas sedimentadas del MagnaRack™.
2. Agregue 200 µL de tampón de elución (E5; Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) al tubo y pipetear hacia arriba y hacia abajo suavemente de 5 a 10 veces para mezclar la muestra sin formar burbujas. Nota: Consulte la página 10 para obtener más información sobre la elución volumen de búfer.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Consejo: Para obtener el máximo rendimiento, mezcle la suspensión de perlas (pipeteando hacia arriba y hacia abajo suavemente) a la mitad de la incubación. Para mayores rendimientos de ADN, realice la elución a una temperatura de 55 °C a 65 °C.
4. Coloque la muestra en el MagnaRack™ durante 1 minuto o hasta que las perlas hayan formado un gránulo apretado.
5. Sin quitar el tubo del MagnaRack™, Retire con cuidado el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de microcentrífuga estéril. Tenga cuidado de no perturbe el sedimento de perlas inclinando la pipeta que la punta apunte lejos de la pastilla. Nota: Si el sobrenadante que contiene el ADN es decolorado, repita los pasos 4 y 5 de este protocolo.
6. Deseche las perlas magnéticas usadas. No reutilice las perlas magnéticas.

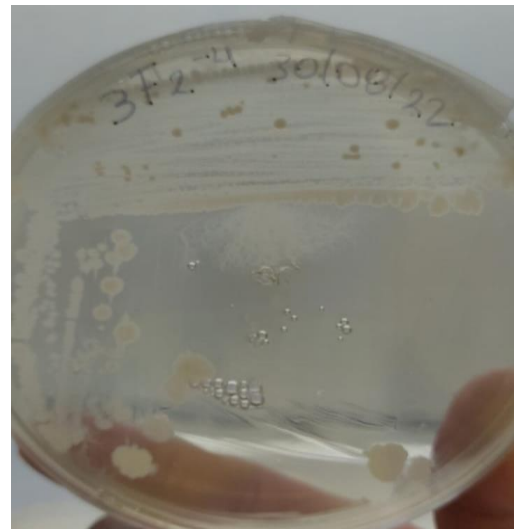
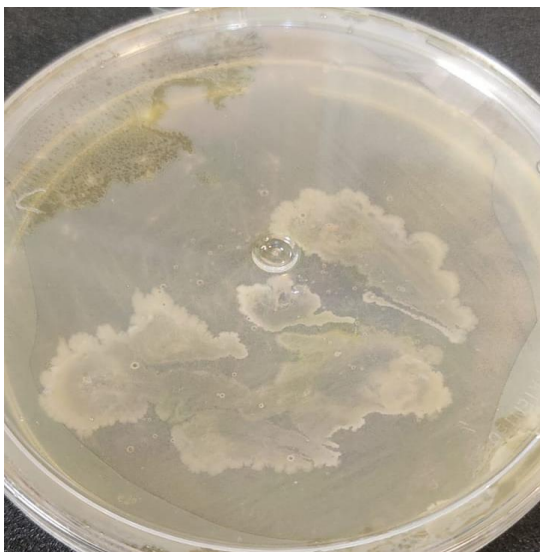
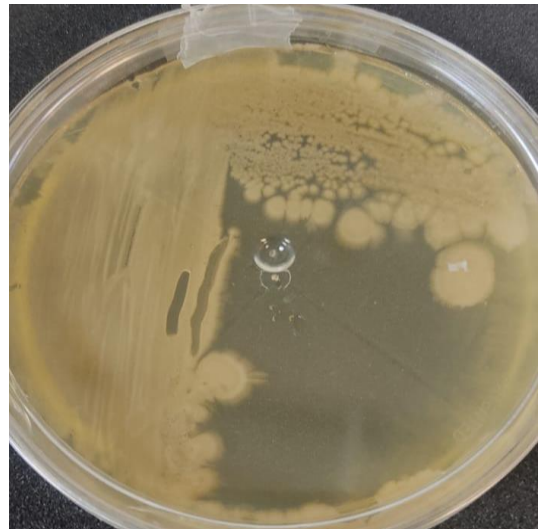
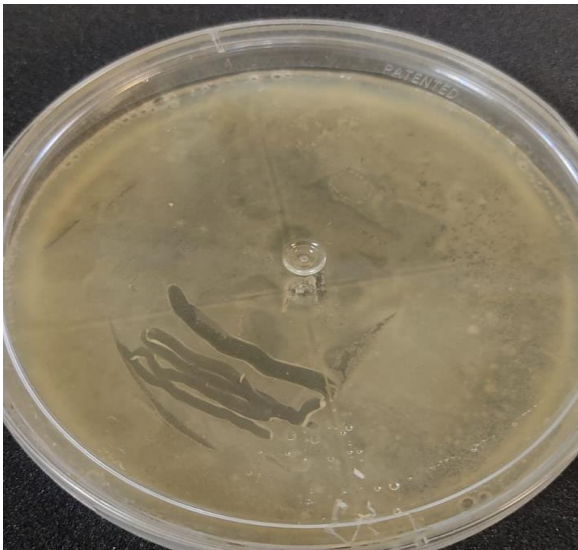
### **Almacenamiento de ADN**

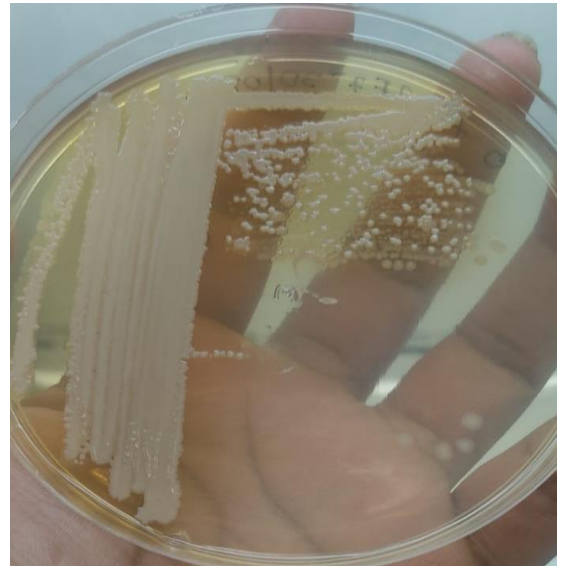
1. Almacene el ADN purificado a –20 °C.
2. Para evitar la congelación y descongelación repetidas del ADN, almacene el ADN purificado a 4°C para uso a corto plazo, o alícuota el ADN y guárdelo a 20°C para almacenamiento a largo plazo.



**Perlas magnéticas para la extracción de ADN.**

**Medio de cultivo con Rizobacterias**





Materiales utilizados para dispensar el medio de cultivo.